

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA AOS HERBICIDAS
INIBIDORES DA ALS NA ESPÉCIE POLIPLÓIDE *Bidens subalternans* DC.

Fabiane Pinto Lamego
Engenheira Agrônoma/UFPel, Mestre/UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia
Área de Concentração Plantas de Lavoura

Porto Alegre (RS), Brasil
Setembro de 2008

DEDICO

Aos meus pais Paulo Roberto e Maria de Jesus, minha irmã Fernanda e ao meu noivo Carlos pelo apoio incondicional.

***“Embora ninguém possa voltar atrás e
fazer um novo começo, qualquer um
pode começar agora e fazer um novo
fim.”***

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Ribas Vidal pela orientação, aprendizado, estímulo e amizade;

A minha família, meus pais Paulo Roberto e Maria de Jesus Lamego pelo exemplo de vida e apoio em todos os momentos;

Ao meu noivo Carlos Eduardo Schaedler por todo amor e dedicação e, também a sua família;

À Professora Nilda Burgos pela excepcional acolhida, ensinamentos e contribuições na realização desta pesquisa;

Aos integrantes da comissão de orientação, Professores Luiz Carlos Federizzi, Carla Andréa Delatorre e Luciane Resende pelas contribuições no aprimoramento deste trabalho e também pelo incentivo;

Aos bolsistas de iniciação científica Augusto Kalsing e Ives Goulart pelo auxílio na condução dos experimentos e pela amizade;

À UFRGS e aos Professores do Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia pelos ensinamentos e, em especial aos funcionários Alice Weber, Fábio Berndt e Jonatan Anton por todo o apoio recebido;

À secretária do PPG Fitotecnia Marisa Bello por sua ajuda e amizade;

Aos amigos e colegas do PPG Fitotecnia pela convivência e amizade, em especial Naracelis Polleto, Anderson Nunes, Everton Brenner, Franceli Kulchenski, Itamar Nava, Josana Abreu, Noryam Bispo e Tatiana Terra.

À amiga Paula Wiethölter por sua amizade e auxílio nas análises citogenéticas;

A Paulo Roberto da Silva pelo convívio e treino nos estudos moleculares e citogenéticos;

À Cecília Baquizeza, Marites Sales e Vinod Shivrain pelo apoio técnico e amizade durante o doutorado-sanduíche e, também Dimitra Loka, Eduardo Kawakami, Fernanda Onofre, Milena Anelim, Redentor Burgos, Sanjeev e Sonyia Bangarwa pelos momentos de descontração e convívio;

Aos professores e funcionários do Departamento Crop, Soil and Environmental Sciences da University of Arkansas, EUA, pela acolhida e convivência;

À Professora Vibha Shirastava e seus orientados Aydin Akbudak e Scott Nicholson pelo treinamento no *Southern Blot* e também pelas contribuições ao trabalho;

Ao Dr. Cláudio Mondim pelo auxílio na identificação taxonômica de *Bidens subalternans*;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro durante o curso e, também pela oportunidade de realização do doutorado-sanduíche;

A Deus que colocou estas pessoas na minha vida e permitiu que este sonho se tornasse realidade.

ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA AOS HERBICIDAS INIBIDORES DA ALS NA ESPÉCIE POLIPLÓIDE *Bidens subalternans* DC.¹

Autor: Fabiane Pinto Lamego
Orientador: Ribas Antonio Vidal
Co-orientador: Luiz Carlos Federizzi

RESUMO

Bidens subalternans é uma das principais infestantes em culturas de verão, sendo controlada, principalmente, por herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS). Entretanto, biótipos resistentes (R) têm sido observados em lavouras por todo o Brasil. O conhecimento do(s) mecanismo(s) de resistência e dos efeitos pleiotrópicos envolvidos é essencial para a elaboração de programas de manejo, evitando a disseminação do problema. A presente pesquisa teve como objetivos avaliar a resposta de biótipo R de *B. subalternans* a quatro grupos químicos dos inibidores da ALS; determinar a base molecular da resistência, através da identificação de mutação(s) causadora(s) da resistência aos herbicidas; comparar valores adaptativos entre os biótipos R e suscetível (S) quando na ausência do agente de seleção; e, determinar a herança genética da resistência de *B. subalternans* aos inibidores da ALS. Os resultados dos experimentos de crescimento de planta e enzimáticos evidenciam que o biótipo R apresenta elevados níveis de resistência devido à insensibilidade da enzima ALS. A espécie tetraplóide *B. subalternans* possui, pelo menos, três alelos para o gene da enzima. A substituição do aminoácido triptofano por leucina na posição 574 em um dos alelos da ALS é responsável pela resistência aos herbicidas. De maneira geral, a mutação na enzima não causa limitação no crescimento e desenvolvimento do biótipo R. Entretanto, caso o efeito pleiotrópico encontrado no biótipo R, germinação precoce em temperaturas frias, se confirme em outros biótipos R aos inibidores de ALS, então ele poderia ser utilizado em estratégias de manejo da resistência. Por exemplo, a postergação da data de semeadura das culturas de verão permitiria eliminar as infestantes que emergirem no período anterior à semeadura com diversas opções de herbicidas com mecanismos de ação alternativos. Ademais, possibilitaria a utilização de outros métodos de controle como o físico ou mecânico. Pela primeira vez na história da ciência brasileira, é elucidada a base molecular da resistência a herbicidas em uma importante espécie daninha.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (152p.) Setembro, 2008.

ELUCIDATION OF THE MECHANISM OF RESISTANCE TO ALS-INHIBITING HERBICIDES IN *Bidens subalternans* DC. POLYPLOID SPECIE¹

Author: Fabiane Pinto Lamego
Adviser: Ribas Antonio Vidal
Co-adviser: Luiz Carlos Federizzi

ABSTRACT

Bidens subalternans is one of the most important weed in summer crops being mainly controlled by herbicides of ALS enzyme inhibitors group. However, resistant biotypes have been observed in crop fields all over Brazil. The knowlegde of the mechanism(s) of resistance and the pleiotropic effects involved are essential to elaborate management programs avoiding the problem dissemination. This research had as objectives to evaluate the response of *B. subalternans* resistant (R) biotype to four chemical families of ALS inhibitors; to determine the molecular basis of resistance through the identification of mutation(s) responsible for herbicides resistance; to compare adaptative values between R and susceptible (S) biotypes when in the absence of the agent of selection; and to determine the genetic inheritance of the resistance to ALS inhibitors in *B. subalternans*. The results of plant growth and enzyme experiments evidence the R biotype presents high level of resistance caused by insensitive ALS enzyme. The tetraploid specie *B. subalternans* harbours, at least, three alleles for the enzyme gene. The substitution of tryptophan by leucine at the 574 position in one of the ALS alleles is responsible for herbicides resistance. In general, the mutation at the enzyme does not cause limitation to the growth and development of the R biotype. However, in case of pleiotropic effect found in the R biotype, the early germination at cold temperatures, being confirmed in other ALS-R biotypes it could be used in management strategies for resistance. For example, the delay in the planting date of summer crops would allow eliminating weeds that emerge before the crop with different options of herbicides belonging to alternative mechanisms of action. In addition, it would enable the use of other methods of control such as physical or mechanical. For the first time in Brazilian science is elucidating the molecular basis of herbicide resistance in an important weed.

² Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (152p.) September, 2008.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 A Resistência de plantas daninhas aos herbicidas e a situação mundial.....	5
2.2 Mecanismos de resistência aos herbicidas.....	7
2.3 Resistência aos herbicidas inibidores de ALS.....	10
2.3.1 Mutações no gene da ALS.....	12
2.4 Detecção da resistência.....	14
2.4.1 Diagnóstico.....	14
2.4.2 Curvas de dose-resposta sobre crescimento de planta.....	16
2.5 A resistência aos herbicidas e valor adaptativo.....	18
2.6 <i>Bidens subalternans</i> e a resistência aos inibidores de ALS....	21
2.7 Genética da resistência aos herbicidas em plantas daninhas.	23
2.8 Manejo da resistência.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Origem dos materiais.....	29
3.2 Curvas de dose-resposta e ensaios enzimáticos.....	29
3.2.1 Curvas de dose-resposta sobre crescimento de planta.....	30
3.2.2 Ensaio enzimático <i>in vivo</i>	33
3.2.3 Análise estatística.....	35
3.3 Seqüenciamento do gene da ALS.....	37
3.3.1 Extração do DNA.....	37
3.3.2 Desenho de <i>primers</i>	38
3.3.3 Amplificação das regiões do gene da ALS e clonagem.....	40
3.3.4 Amplificação do gene completo da ALS.....	41
3.3.5 Análise das seqüências amplificadas.....	42
3.4 <i>Southern Blot</i>	43
3.4.1 Digestão do DNA.....	43
3.4.2 Preparo da membrana e hibridização.....	44
3.5 Comparação de valores adaptativos.....	45
3.5.1 Crescimento relativo.....	45
3.5.2 Germinação das sementes.....	47
3.5.3 Análise estatística.....	48
3.5.4 Série de substituição.....	50
3.6 Genética da resistência.....	54

3.6.1	Contagem de cromossomos.....	54
3.6.2	Estudo de herança genética.....	56
4.	RESULTADOS.....	59
4.1	Curvas de dose-resposta e ensaios enzimáticos.....	59
4.1.1	Curvas de dose-resposta sobre crescimento de planta.....	59
4.1.2	Ensaio enzimático.....	64
4.2	Sequenciamento do gene da ALS.....	66
4.2.1	Amplificação parcial do gene da ALS.....	66
4.2.2	Clonagem das regiões 1 e 2 do gene da ALS.....	69
4.2.3	Análise das seqüências do gene da ALS.....	70
4.3	Comparação de valores adaptativos.....	79
4.3.1	Crescimento relativo.....	79
4.3.2	Germinação das sementes.....	87
4.3.3	Série de substituição.....	92
4.4	Genética da resistência.....	94
4.4.1	Contagem de cromossomos.....	94
4.4.2	Estudo de herança genética.....	95
5.	DISCUSSÃO.....	98
5.1	Confirmação da espécie.....	98
5.2	Curvas de dose-resposta e ensaios enzimáticos.....	99
5.2.1	Curvas de dose-resposta sobre crescimento de planta.....	99
5.2.2	Ensaio enzimático.....	102
5.3	Base molecular e genética da resistência.....	104
5.4	Comparação de valores adaptativos.....	113
5.5	Considerações finais.....	119
6.	CONCLUSÕES.....	127
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128
8.	APÊNDICES.....	142
9.	VITA.....	152

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Tratamentos herbicidas utilizados no ensaio de curva de dose-resposta (Ensaio 1) em biótipos de <i>Bidens subalternans</i> suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da enzima ALS. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2006.....	31
2. Tratamentos herbicidas utilizados no ensaio de curva de dose-resposta (Ensaio 2) em biótipos de <i>Bidens subalternans</i> suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da enzima ALS. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008.....	32
3. Tratamentos herbicidas utilizados nos ensaios da enzima ALS <i>in vivo</i> de biótipos de <i>Bidens subalternans</i> suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da enzima ALS. University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.....	34
4. <i>Primers</i> usados para amplificação do gene da enzima acetolactato sintase (ALS) em <i>Bidens subalternans</i>	39
5. Equação utilizada para determinar a dose necessária para obter 50% de controle (C_{50}) das plantas dos biótipos de <i>Bidens subalternans</i> suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da ALS – Ensaio 1. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2006.....	59
6. Equação ^a utilizada para determinar a dose necessária para obter 50% de controle (C_{50}) das plantas dos biótipos de <i>Bidens subalternans</i> suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da ALS – Ensaio 2. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008.....	61
7. Equação utilizada para determinar a dose necessária para obter 50% de redução da massa seca (GR_{50}) das plantas dos biótipos de <i>Bidens subalternans</i> suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da ALS – Ensaio 2. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008.....	63
8. Equação utilizada para determinar a dose necessária para reduzir 50% da atividade de ALS (I_{50}) nos ensaios enzimáticos <i>in vivo</i> dos biótipos de <i>Bidens subalternans</i> suscetível (S) e	

resistente (R) aos herbicidas inibidores da mesma. University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.....	65
9. Polimorfismos de nucleotídeos e aminoácidos das seqüências do gene da ALS, referentes ao domínio B, de biótipos resistente e suscetível de <i>Bidens subalternans</i>	75
10. Tempo médio de germinação (dia), taxa de germinação (semente/dia), coeficiente de velocidade de germinação (%) e peso de sementes de <i>Bidens subalternans</i> suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS. University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.....	89
11. Parâmetros da equação ^a utilizada para calcular o tempo (dias) requerido para obter 60% de germinação (x_{60}) das sementes dos biótipos de <i>Bidens subalternans</i> suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da ALS. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008.....	90
12. Diferenças relativas de produtividade (DPR) para a variável matéria da parte aérea seca, e produtividade relativa total (PRT), nas proporções 75:25, 50:50 e 25:75 de plantas dos biótipos de <i>Bidens subalternans</i> suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS, associados. University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.....	93
13. Índices de competitividade entre biótipos de <i>Bidens subalternans</i> suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS, expressos por competitividade relativa (CR) e coeficientes de agrupamento relativo (K) e de competitividade (A). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.....	93
14. Resposta à interferência dos biótipos de <i>Bidens subalternans</i> suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da ALS, 42 dias após a emergência. University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.....	94

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Representação esquemática do gene da enzima ALS e <i>primers</i> usados para sua amplificação.....	39
2. Esquema de distribuição nos vasos das plantas dos biótipos suscetível (círculos claros) e resistente (círculos escuros) de <i>B. subalternans</i> . University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.....	52
3. Controle dos biótipos de <i>Bidens subalternans</i> suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS com os herbicidas chlorimuron-ethyl (A), imazethapyr (B), cloransulam-methyl (C) e bispyribac-sodium (D), 21 dias após a aplicação dos tratamentos - Ensaio 1. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2006.....	60
4. Controle dos biótipos de <i>Bidens subalternans</i> suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS com os herbicidas chlorimuron-ethyl (A), imazethapyr (B), cloransulam-methyl (C) e pyriithiobac-sodium (D), 28 dias após a aplicação dos tratamentos - Ensaio 2. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008.....	62
5. Redução da massa seca da parte aérea dos biótipos de <i>Bidens subalternans</i> suscetível e resistente aos inibidores da ALS em função da aplicação dos herbicidas chlorimuron-ethyl (A), imazethapyr (B), cloransulam-methyl (C) e pyriithiobac-sodium (D) - Ensaio 2. UFRGS, Porto Alegre - RS, 2008.....	64
6. Efeito dos herbicidas chlorimuron-ethyl (A), imazethapyr (B), cloransulam-methyl (C) e pyriithiobac-sodium (D) na atividade da enzima ALS dos biótipos de <i>Bidens subalternans</i> suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS. University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.....	66
7. Produtos da amplificação dos domínios C, A, D (1 = suscetível; 2 = resistente) e B, E (3) do gene da ALS em <i>Bidens subalternans</i> , separados em gel de agarose 0,8%, corados com brometo de etídio. Marcador 100pb (M). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.....	67
8. Produto da amplificação dos domínios C, A, D do gene da ALS	

em biótipo suscetível de <i>Bidens subalternans</i> , separado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio. Marcador 100pb (M). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.....	68
9. Produto da amplificação da região intermediária entre os domínios conservados do gene da ALS em biótipo suscetível de <i>Bidens subalternans</i> , separado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio. Marcador 100pb (M). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.....	68
10. Verificação da presença do inserto no plasmídeo, na clonagem dos domínios C, A, D do gene da ALS de <i>Bidens subalternans</i> . Produtos separados em gel de agarose 0,8%, corados com brometo de etídio. Marcador 1Kb (M). University of Arkansas, Fayetteville – AR, 2007.....	69
11. Produto da amplificação dos domínios B, E do gene da enzima ALS em biótipo suscetível de <i>Bidens subalternans</i> , separado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio. Marcador 1Kb (M). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.....	70
12. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos dos domínios C, A, D do gene da enzima ALS dos biótipos suscetível (S_) e resistente (R_) de <i>Bidens subalternans</i> , com a seqüência do mesmo gene de <i>Arabidopsis thaliana</i> (acesso X51514, GenBank). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.....	71
13. Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos domínios C, A, D da enzima ALS dos biótipos suscetível (S_) e resistente (R_) de <i>Bidens subalternans</i> com a seqüência do mesmo gene de <i>Arabidopsis thaliana</i> (seqüência protéica correspondente ao acesso X51514, GenBank). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.....	72
14. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da região intermediária entre os domínios conservados do gene da enzima ALS dos biótipos suscetível (S_) e resistente (R_) de <i>Bidens subalternans</i> , com a seqüência do mesmo gene de <i>Arabidopsis thaliana</i> (acesso X51514, GenBank). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.....	74
15. Alinhamento das seqüências de aminoácidos da região intermediária entre os domínios conservados da enzima ALS dos biótipos suscetível (S_) e resistente (R_) de <i>Bidens subalternans</i> , com a seqüência do mesmo gene de <i>Arabidopsis thaliana</i> (seqüência protéica correspondente ao acesso X51514, GenBank). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.....	75

16. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos dos domínios B, E do gene da enzima ALS dos biótipos suscetível (S_) e resistente (R_) de <i>Bidens subalternans</i> , com a seqüência do mesmo gene de <i>Arabidopsis thaliana</i> (acesso X51514, GenBank). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.....	76
17. Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos domínios B, E da enzima ALS dos biótipos suscetível (S_) e resistente (R_) de <i>Bidens subalternans</i> , com a seqüência do mesmo gene de <i>Arabidopsis thaliana</i> (seqüência protéica correspondente ao acesso X51514, GenBank). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.....	77
18. Alinhamento da seqüência de aminoácidos do alelo (ALS1) da enzima ALS dos biótipos suscetível (S_) e resistente (R_) de <i>Bidens subalternans</i> , com a seqüência do mesmo gene de <i>Arabidopsis thaliana</i> (seqüência protéica correspondente ao acesso X51514, GenBank). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.....	78
19. Análise da hibridização <i>Southern Blot</i> do gene da ALS em <i>Bidens subalternans</i> . DNA digerido com BamHI e a seqüência dos domínios C, A, D (S_ALS3), utilizada como sonda. Marcador 1Kb. University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007...	79
20. Estatura de planta dos biótipos de <i>Bidens subalternans</i> suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS, avaliada semanalmente até o florescimento. University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.....	80
21. Estatura de planta de biótipos de <i>Bidens subalternans</i> suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS, avaliada semanalmente até o florescimento. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008.....	81
22. Massa seca da parte aérea dos biótipos de <i>Bidens subalternans</i> suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS. University of Arkansas, Fayetteville – AR, 2007.....	82
23. Massa seca da parte aérea dos biótipos de <i>Bidens subalternans</i> suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008.....	83
24. Massa seca de raízes dos biótipos de <i>Bidens subalternans</i> suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS. University of Arkansas, Fayetteville – AR, 2007.....	84
25. Massa seca de raízes dos biótipos de <i>Bidens subalternans</i> suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008.....	84

26. Massa seca total de <i>Bidens subalternans</i> suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS. University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.....	85
27. Massa seca total de <i>Bidens subalternans</i> suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS. UFRGS, Porto Alegre - RS, 2008.....	86
28. Relação da massa seca da parte aérea e raízes de <i>Bidens subalternans</i> suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS. University of Arkansas, Fayetteville – AR, 2007.....	87
29. Germinação acumulada das sementes de <i>Bidens subalternans</i> suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS, submetidas às temperaturas de 28/25°C. University of Arkansas, Fayetteville – AR, 2007.....	88
30. Germinação acumulada das sementes de <i>Bidens subalternans</i> suscetível (•) e resistente (o) aos herbicidas inibidores da ALS, quando submetidas à temperatura de 15,1°C. As equações e os parâmetros são apresentados na Tabela 11. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008.....	91
31. Produtividade relativa (PR) e total (PRT) para massa seca da parte aérea (MSPA) dos biótipos de <i>Bidens subalternans</i> suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS. University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.....	92
32. Célula meiótica de <i>Bidens subalternans</i> , metáfase I. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2006.....	95
33. Metáfases mitóticas. (A) <i>Bidens subalternans</i> (2n=48). (B) <i>Bidens pilosa</i> (2n=72). UFRGS, Porto Alegre – RS, 2006.....	95
34. Cruzamentos em <i>Bidens subalternans</i> . (A) Lavagem da flor que irá receber pólen de outra planta. (B) Semente F1, oriunda do cruzamento SxR. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2006.....	96

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

μL	microlitro
μM	micromolar
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
ACCCase	enzima acetil coenzima-A carboxilase
Al	alumínio
Ala/A ₁₂₂ /A ₂₀₅	alanina
ALS	enzima acetolactato sintase
AR	Arkansas
BLASTn	basic local alignment source toll – alinhamento com seqüências de nucleotídeos
BLASTx	basic local alignment source toll – alinhamento com seqüências protéicas
C ₅₀	dose herbicida necessária para causar 50% de controle
Ca	cálcio
CCCV	câmara climatizada de crescimento vegetal
cm	centímetro
CO ₂	gás carbônico
CTC	capacidade de troca de cátions
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
CVG	coeficiente de velocidade de germinação
D1	proteína D1

DAE	dias após a emergência
DAT	dias após a aplicação dos tratamentos
DMS	diferença mínima significativa
EPSPS	enzima enol piruvil shiquimato fosfato sintase
FS2	fotossistema II
g	grama
G ₃₆₇ / Gly	glicina
Glu	glutamato
GR ₅₀	dose herbicida necessária para reduzir em 50% a massa seca da parte aérea
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
I ₅₀	dose herbicida necessária para provocar 50% de inibição da atividade da enzima
IMI	grupo químico das imidazolinonas
K	potássio
KARI	enzima cetoácido reductoisomerase
kg	kilograma
Leu	leucina
M	molar
Met	metionina
mg	miligramas
Mg	magnésio
MLIT	tempo médio de germinação
mM	milimolar
MSPA	massa seca (desidratada) da parte aérea
MSR	massa seca (desidratada) de raízes

MST	massa seca (desidratada) total
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	nanograma
P	fósforo
PCR	reação em cadeia de polimerase
Phe	fenilalanina
PR	produtividade relativa
PRT	produtividade relativa total
Pro/P ₁₉₇	prolina
PTB	grupo químico dos pirimidil-benzoatos
Qa	quinona A
Qb	quinona B
R	biótipo resistente
rpm	rotações por minuto
S	biótipo suscetível
S ₆₅₃	serina
SCT	grupo químico das sulfonilamino-carboniltriazolinonas
SU	grupo químico das sulfoniluréias
TCR	taxa de crescimento relativo
TG	taxa de germinação
TP	grupo químico das sulfonanilidas
Trp	triptofano
URA	umidade relativa do ar
Val	valina
W ₅₇₄	triptofano

1 INTRODUÇÃO

O controle de plantas daninhas com herbicidas é prática bastante comum na agricultura. Todavia, o seu uso indiscriminado tem propiciado o desenvolvimento de muitos casos de resistência a tais compostos, por diversas espécies daninhas, fenômeno esse difundido mundialmente. Nos tempos atuais, a resistência aos herbicidas por plantas infestantes tem sido tema de debates nacionais e internacionais, dada a importância de suas consequências sobre a produtividade dos cultivos agrícolas.

A soja está entre os principais cultivos da agricultura brasileira. Aproximadamente 20 milhões de hectares são cultivados todo o ano nas diferentes regiões do país, sendo grande parte desta produção exportada. Herbicidas do grupo dos inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) estão entre aqueles mais utilizados nas lavouras de soja não transgênicas no Brasil. Eles constituem importante grupo de herbicidas devido à utilização em doses reduzidas, elevada seletividade para a cultura e também ao grande espectro de infestantes controladas.

Após anos seguidos da utilização dos inibidores de ALS em lavouras de soja, biótipos de *Bidens subalternans* DC. (picão-preto) evoluíram resistência a estes herbicidas no Estado do Mato Grosso do Sul. Picão-preto é considerada uma importante infestante na cultura da soja, mas ocorre em outras, tais como o milho e o algodão. Dada a contínua pressão de seleção imposta pelos

herbicidas, em pouco tempo, populações de picão resistentes aos inibidores de ALS são encontradas em lavouras de soja espalhadas por todo o Brasil.

Com o avanço do cultivo da soja transgênica, o que elimina a diversidade de herbicidas comumente utilizados nas lavouras de soja, não têm sido observados nessas lavouras novos casos de espécies daninhas resistentes aos inibidores de ALS. Entretanto, o sistema de rotação soja-milho ou soja-algodão, prática comum nos estados da região Centro-oeste como Goiás e Mato Grosso e também no estado do Paraná na região Sul, revelam ano a ano biótipos de *B. subalternans* resistentes aos inibidores de ALS.

A resistência de plantas daninhas aos herbicidas assume grande importância, principalmente em razão do limitado, ou inexistente número de herbicidas alternativos para serem usados no controle destes biótipos. O número de ingredientes ativos disponíveis para controle de algumas espécies daninhas é bastante restrito e, o custo para a descoberta de novas moléculas, bastante elevado. Portanto, neste caso, o controle dos biótipos resistentes com o uso de herbicidas fica comprometido, o que restringe esta prática a outros métodos, muitas vezes, menos eficientes. Ou ainda, quando é possível substituir o mecanismo de ação herbicida, nova pressão de seleção será exercida sobre a população de plantas daninhas da área, o que pode levar à resistência futuramente.

Dada a importância do controle das plantas daninhas para que sejam garantidos elevados níveis de produtividade dos cultivos agrícolas, a falha deste pode comprometer drasticamente a produção, além de proporcionar aumento nos custos da lavoura. Desta forma, a adoção de estratégias que busquem prevenir a resistência como a prática da rotação de culturas, sistemas

de cultivo, manejo dos herbicidas utilizados, observação do nível de dano econômico, dentre outras, mesmo que representem aumento no custo de produção, ainda serão menores do que o que será gasto uma vez que a resistência seja manifestada.

Uma vez comprovada a resistência, uma das grandes preocupações é desenvolver estratégias para o manejo dessas plantas nas lavouras, evitando a dispersão delas para novas áreas. Entretanto, para o desenvolvimento de novas estratégias é necessário conhecer as causas que levaram os biótipos a desenvolver resistência, bem como conhecer a capacidade competitiva destes novos biótipos em relação àqueles suscetíveis. Faz-se necessário compreender melhor a interação entre mecanismo de ação herbicida, ecologia da planta daninha, genética e mecanismos de resistência envolvidos. Estudos que abordem esta complexa interação ainda são carentes neste país, apesar de fundamentais para auxiliar na escolha do manejo adotado e preventivo à dispersão da resistência.

Portanto, dada a ausência da abordagem de aspectos relevantes para o maior entendimento da resistência e que auxiliem na busca de alternativas para o manejo de *B. subalternans* resistente aos inibidores de ALS, o presente trabalho propõem-se a explorar este tema, buscando fornecer subsídios como ferramentas para auxiliar no manejo e na prevenção da resistência. A partir dos resultados obtidos, modelos matemáticos poderão estimar o tempo da evolução da resistência auxiliando na prevenção da mesma.

O presente estudo teve por hipóteses: i) biótipo de *Bidens subalternans* resistente aos herbicidas inibidores da enzima ALS, apresenta resistência cruzada aos diferentes grupos químicos de inibidores da enzima; ii) local de

ação alterado, causado por mutação(s) no(s) gene(s) da enzima ALS, é o responsável pela perda de afinidade de moléculas herbicidas com a enzima, resultando no fenômeno evolutivo da resistência em *B. subalternans*; iii) não há diferença quanto o valor adaptativo entre os biótipos de *B. subalternans* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS e, portanto, os biótipos apresentam similaridade quanto ao crescimento e capacidade reprodutiva; e, iv) gene maior ou poucos genes de grande efeito, com herança nuclear, controlam a resistência aos herbicidas inibidores de ALS em biótipo de *B. subalternans*.

Assim, os objetivos gerais deste trabalho foram: i) avaliar a resposta de biótipo resistente de *B. subalternans* a herbicidas inibidores da enzima ALS, pertencentes aos quatro grupos químicos dos inibidores: sulfoniluréias, imidazolinonas, sulfonanilidas e pirimidil-benzoatos; ii) determinar a base molecular da resistência aos herbicidas inibidores da enzima ALS em *B. subalternans* através do seqüenciamento do gene da ALS e, da identificação de mutação(s) associada(s) com a resistência aos herbicidas; iii) comparar valores adaptativos de biótipos resistente e suscetível de *B. subalternans* quando na ausência do agente de seleção; e, iv) determinar a herança genética e o número de genes envolvidos na resistência de biótipo de *B. subalternans* aos herbicidas inibidores da enzima ALS.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Resistência de plantas daninhas aos herbicidas e a situação mundial

Resistência aos herbicidas é definida como a característica herdável de uma planta que lhe confere capacidade de sobreviver e de se reproduzir após a exposição continuada a determinado composto químico, em dose que normalmente é letal à espécie (Vidal & Merotto Jr., 2001). Uma planta é considerada sensível a determinado herbicida quando seu crescimento e desenvolvimento são alterados pela ação do produto, causando sua morte. Já, a planta tolerante é aquela que apresenta capacidade inata de sobreviver e se reproduzir depois de exposta ao herbicida, mesmo sofrendo injúrias (HRAC, 2008). Um exemplo típico de tolerância ocorre em *Ipomoea* spp., tolerante ao herbicida glyphosate (Monquero *et al.*, 2004). Estas características encontradas em populações de plantas daninhas estão relacionadas com a variabilidade genética natural da espécie.

O surgimento de biótipos de plantas daninhas resistentes a certos herbicidas tem ocorrido em áreas onde há utilização repetida e subsequente de um ou de diferentes herbicidas, mas com o mesmo mecanismo de ação. Este tipo de situação ocorre geralmente em sistemas intensivos de monocultivo, onde os herbicidas são aplicados com o objetivo de eliminar quase toda a

população de plantas daninhas incidentes, ou seja, utiliza-se elevada pressão de seleção (Powles & Shaner, 2001).

Mundialmente, o primeiro relato de planta daninha resistente a herbicidas ocorreu no Canadá, em 1952, com biótipo da espécie *Daucus carota* L. (cenoura-selvagem) resistente ao mimetizador de auxina 2,4-D (Switzer, 1952). Cinco anos depois, *Commelina difusa* Burman. foi relatada também como resistente ao 2,4-D nos Estados Unidos (Hilton, 1957). Em 1970, biótipos de *Senecio vulgaris* L. foram constatados como resistentes ao herbicida simazine, uma triazina pertencente ao grupo dos inibidores do fotossistema II (FS2) (Ryan, 1970). Até o início da década de 80, 67% dos casos de resistência documentados envolviam as triazinas, 13% os bipiridílios e 12% herbicidas auxínicos, com os demais mecanismos de ação herbicida perfazendo 8% dos casos de resistência (Heap, 2008). Contudo, as estatísticas mudaram a partir dos anos 80, com a introdução no mercado mundial de novos grupos herbicidas como os inibidores das enzimas acetolactato sintase (ALS) e acetil-CoA carboxilase (ACCase). Estes grupos de compostos apresentam características favoráveis à seleção de plantas daninhas resistentes, tais como: elevada pressão de seleção; grande frequência de uso; e acentuada especificidade entre o herbicida e a enzima alvo de sua ação.

Atualmente, no mundo existem cerca de 320 biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas, envolvendo 185 espécies (Heap, 2008). O maior número de casos de resistência envolve os inibidores da ALS, seguido pelos inibidores do FS2 e inibidores da ACCase (Heap, 2008). A resistência aos inibidores da enzima enol-piruvil shiquimato fosfato sintase (EPSPS), representado pelo glyphosate, tem crescido acentuadamente em função do

incremento da utilização deste herbicida devido ao reduzido custo e à ampliação da área cultivada com culturas transgênicas resistentes ao mesmo. Nos Estados Unidos, onde 100% da soja cultivada é transgênica, 38% dos biótipos (29 plantas de um total de 75) registrados, a partir do ano 2000, como resistentes aos herbicidas se referiam à resistência ao glyphosate (De Prado *et al.*, 2007).

No Brasil, o primeiro registro de resistência ocorreu em 1992 com *Euphorbia heterophylla* L. (leiteira), resistente aos herbicidas inibidores de ALS (Gazziero *et al.*, 1998). Em seguida, biótipos de *Bidens pilosa* L. e *Bidens subalternans* foram encontrados resistentes aos inibidores de ALS em lavouras no Mato Grosso do Sul, nos anos de 1993 e 1996, respectivamente (Monquero, 1999; Christofolleti & Foloni, 1999). Atualmente, existem 19 espécies daninhas registradas como resistentes aos herbicidas no Brasil. Há predominância de espécies resistentes aos inibidores de ALS, o que equivale a 50% dos casos registrados, seguidos dos inibidores da EPSPS com 23% (Heap, 2008).

2.2 Mecanismos de resistência aos herbicidas

Plantas daninhas apresentam resistência aos herbicidas através de diferentes mecanismos: absorção reduzida do produto, redução na quantidade de herbicida que atinge o local de ação da planta-alvo através de translocação reduzida ou seqüestro/compartimentalização do produto, metabolização acentuada com elevada expressão de enzimas capazes de metabolizar a molécula herbicida, ou ainda, local de ação alterado, evitando a ligação da molécula herbicida ou superexpressão de proteínas ligadas à enzima alvo (Powles & Shaner, 2001).

Plantas resistentes aos herbicidas por metabolização acentuada possuem a capacidade de decompor a molécula química mais rapidamente do que plantas sensíveis, tornando-a inativa. As formas de metabolismo incluem hidrólise, redução ou oxidação, de onde surgem grupamentos adequados para conjugação com glutathione (GSH) e aminoácidos (Kreuz *et al.*, 1996). Na oxidação, citocromo P450-monooxigenase tem papel fundamental, fazendo a hidroxilação de anéis aromáticos (Kreuz *et al.*, 1996). Este tipo de mecanismo, em geral, não tem sido associado com a resistência aos inibidores de ALS. Entretanto, biótipos de *Lolium rigidum* Gaud. e *Alopecurus myosuroides* Huds. demonstraram capacidade de rápida detoxificação de herbicidas inibidores de ALS (Kemp *et al.*, 1990; Christopher *et al.*, 1991).

A compartimentalização ou seqüestro herbicida consiste na captura e armazenamento da molécula em locais inativos, como o vacúolo, ou presos na parede celular, impedindo sua atividade e translocação até o local de ação. Este tipo de mecanismo de resistência foi observado em espécies resistentes ao herbicida paraquat (Hart & Di Tomaso, 1994). *Conyza canadensis* (L.) Cronquist. (buva) e *Lolium rigidum* têm apresentado reduzida translocação de glyphosate para tecidos meristemáticos, sendo este observado como um dos mecanismos de resistência (Powles & Preston, 2006).

A resistência pelo local de ação alterado é resultado de mutação, ou seja, de alteração de uma ou mais bases nitrogenadas dando origem a uma enzima modificada, impedindo a ligação do herbicida. Pequena alteração em um polipeptídeo pode resultar em grande efeito sobre sua afinidade com a molécula herbicida (Betts *et al.*, 1992). Caso a mutação codifique um aminoácido que componha o centro ativo da enzima, a probabilidade de suas

características cinéticas serem modificadas é grande. Em estudo comparando enzimas ALS de biótipos de leiteira suscetíveis e resistentes não foi constatada mudança significativa na afinidade da enzima pelo substrato; entretanto, a atividade da mesma foi alterada (Vargas *et al.*, 1999). Em biótipo de arroz-vermelho foi constatada uma mudança conformacional na estrutura da ALS, a qual aumentou a ligação do cofator tiamina difosfato e, conseqüentemente, incrementou a atividade da enzima, contribuindo, conseqüentemente, para redução da sua sensibilidade ao herbicida imazethapyr (Sales *et al.*, 2008).

A maioria dos casos de resistência aos herbicidas estudados é devido ao local de ação herbicida alterado. Este também tem sido o principal mecanismo de resistência aos inibidores da ALS através de mutações em regiões conservadas do gene da enzima (McNaughton *et al.*, 2005; Christoffers *et al.*, 2006; Whaley *et al.*, 2007).

A resistência aos herbicidas é classificada como cruzada quando no local de ação herbicida, na planta alvo, ocorre uma mudança bioquímica conferindo resistência a moléculas de diferentes grupos químicos, mas que agem naquele mesmo local de ação. Biótipos de leiteira, *Lolium rigidum* e *Kochia scoparia* (L.) Roth têm mostrado resistência cruzada aos diferentes grupos químicos dos inibidores de ALS (Powles & Preston, 1998; Vargas *et al.*, 1999). Biótipo de *Bidens pilosa* apresentou resistência cruzada a dois grupos químicos dos inibidores de ALS (Monquero & Christoffoleti, 2001). Também *Sinapis arvensis* L. apresentou resistência cruzada aos inibidores de ALS (Christoffers *et al.*, 2006).

A resistência múltipla é um problema de maior complexidade e de difícil solução uma vez que dois ou mais mecanismos conferem resistência a um

produto ou a um ou mais herbicidas (Powles & Holtum, 1994). *Lolium rigidum* é capaz de metabolizar herbicidas inibidores de ALS, ACCase e FS2, além de possuir ACCase e ALS mutadas (Powles & Preston, 1998; Kuk & Burgos, 2007). Biótipos de leiteira provenientes de lavouras de soja no Rio Grande do Sul têm mostrado resistência múltipla aos inibidores de ALS e ao glyphosate também (Vidal *et al.*, 2007), enquanto que biótipos oriundos do estado do Paraná apresentaram resistência múltipla aos herbicidas inibidores da enzima proto-porfirinogênio oxidase (PROTOX) e também aos inibidores de ALS (Trezzi *et al.*, 2005).

2.3 Resistência aos herbicidas inibidores de ALS

A enzima acetolactato sintase é encontrada em plantas, fungos e bactérias e é a primeira enzima da rota de síntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina (Umberger, 1978). ALS catalisa a descarboxilação de uma molécula de piruvato e sua condensação com outra molécula de piruvato ou com α -cetobutirato. A primeira reação produz acetolactato, precursor da valina e leucina, enquanto que a segunda reação produz acetohidroxitirato, o que conduz à síntese de isoleucina (Chipman *et al.*, 1998). A inibição desta enzima leva à falta destes aminoácidos essenciais à planta, causando sua morte.

A ALS caracteriza-se por possuir dois tipos de subunidades: uma catalítica e outra regulatória (Duggleby *et al.*, 2008). A subunidade catalítica requer tiamina difosfato, cofator essencial, e também se caracteriza pela presença de peptídeo de trânsito subseqüentemente removido, que tem a função de direcionar a proteína aos cloroplastos. Já, a subunidade regulatória não atua como ALS propriamente dita, mas é responsável por estimular a

subunidade catalítica. Portanto, ela é necessária para que a enzima ALS seja inibida pelos aminoácidos valina, leucina e isoleucina num processo de regulação (Duggleby *et al.*, 2008).

A introdução no mercado herbicida dos inibidores de ALS na década de 80 representou um grande avanço no controle de infestantes, devido ao seu amplo espectro de ação, atividade residual no solo, doses reduzidas, elevada seletividade para diversas culturas importantes, além de um perfil toxicológico bastante favorável por atuar sobre uma enzima ausente em mamíferos (Mazur & Falco, 1989; Vidal & Merotto Jr., 2001). Estes herbicidas compõem uma das classes mais numerosas de produtos registrados, sendo distribuídos em cinco grupos químicos: imidazolinona (IMI), sulfoniluréia (SU), triazol-pirimidina sulfonilamida (TP), pirimidil-benzoato (PTB) e sulfonilamino-carbonilimidazolinona (SCT) (Vidal & Merotto Jr., 2001; Whaley *et al.*, 2007).

A intensidade de seleção para resistência está relacionada à dose herbicida utilizada, à intensidade de uso, à persistência do mesmo no ambiente, bem como a sua especificidade. Herbicidas com poder residual, ou seja, que permanecem mais tempo no ambiente exercem maior pressão de seleção juntamente com aqueles produtos que apresentam alta especificidade. Herbicidas do grupo dos inibidores de ALS enquadram-se neste perfil, causando mortalidade nas plantas alvo entre 95 e 99% e por isso, também lideram o número de casos de resistência mundialmente (Heap, 2008). O primeiro caso de resistência aos inibidores de ALS observado ocorreu na Austrália, com *Lolium rigidum* (Heap & Knight, 1986). Cinco anos após a introdução destes herbicidas nos Estados Unidos, *Lactuca serriola* L. e *Kochia*

scoparia foram identificadas em Idaho e Kansas, respectivamente, também como resistentes (Mallory-Smith *et al.*, 1990; Saari *et al.*, 1990).

2.3.1 Mutações no gene da ALS

Diferentes mutações conferindo resistência aos inibidores de ALS têm sido observadas classicamente em regiões altamente conservadas do gene da enzima, denominadas de A, B, C, D e E (Tranel & Wright, 2002). *Introns*, em geral, não têm sido encontrados nos genes da ALS seqüenciados (Scarabel *et al.*, 2004). Entretanto, Uchino *et al.* (2007) identificaram um *intron* em cada um dos dois genes da ALS seqüenciados de *Schoenoplectus juncooides*. McNaughton *et al.*, (2005) seqüenciaram o gene completo de ALS da espécie daninha caruru (*Amaranthus retroflexus* L.), incluindo a região correspondente ao peptídeo de trânsito. O gene apresentou 2065pb, traduzidos em 687 aminoácidos e a seqüência encontra-se depositada no GenBank (acesso AF363369).

Das cinco regiões do gene da ALS onde têm ocorrido substituições, três estão localizadas na região N-terminal: alanina (Ala₁₂₂), prolina (Pro₁₉₇), alanina (Ala₂₀₅) e duas próximas à região carboxi-terminal do gene: triptofano (Trp₅₇₄) e serina (Ser₆₅₃) (Siminszky *et al.*, 2005), numeradas de acordo com a seqüência do gene da ALS de *Arabidopsis thaliana* (seqüência protéica referente ao acesso X51514, GenBank). Recentemente, Whaley *et al.* (2007) reportaram a substituição de aspartato (Asp) por glutamato (Glu) na posição 376 do gene encontrada em biótipo de *Amaranthus hybridus* L., conferindo resistência aos cinco grupos químicos de inibidores de ALS. Mutação nesta posição, até então, não havia sido reportada, uma vez que ela encontra-se fora dos cinco domínios

conservados do gene da ALS, na chamada região intermediária. Recentemente, acessos de arroz-vermelho nos Estados Unidos foram observados como resistentes ao herbicida imazethapyr, utilizado no controle desta planta daninha na cultura do arroz irrigado através da tecnologia Clearfield (Sales *et al.*, 2008). O sequenciamento do gene da ALS destes biótipos e seu alinhamento com o do arroz cultivado revelaram alterações de glicina (Gly) por glutamato (Gly₆₅₄Glu), afetando a ligação de imazethapyr ao local ativo na enzima ALS e, também, uma alteração de valina (Val) por metionina (Met) na posição 669. Estas mutações evitam a ligação dos herbicidas à ALS, mas mantêm a mesma funcional uma vez que o local de ligação dos herbicidas é separado do local catalítico enzimático (Pang *et al.*, 2003).

Em geral, de todas as seqüências conhecidas do gene da ALS, as cinco regiões têm sido encontradas com seqüências muito semelhantes. Exceções conhecidas são as espécies *Xanthium strumarium* L. (carrapichão) e *Ambrosia artemisiifolia* L. que possuem alanina ao invés de serina na posição 653 (Tranel & Wright, 2002). Apesar da alta conservação do gene de ALS entre as espécies vegetais, em geral as seqüências diferem em tamanho devido a adições e deleções não conservadas (Tranel & Wright, 2002).

Diferentes mutações no gene de ALS causam diferentes padrões de resistência aos herbicidas. Substituições na Ala₁₂₂ têm conferido resistência ao grupo das IMI e PTB herbicidas; mutações em Trp₅₇₄ conferem resistência cruzada a quatro grupos químicos de inibidores de ALS; mutações na Pro₁₉₇ têm conferido resistência às SU e na Ser₆₅₃ às IMI apenas (Tranel & Wright, 2002). Alguns dos herbicidas que compõem o grupo dos inibidores de ALS possuem similar posição de ligação à enzima-alvo. Como consequência disto,

diversos casos de resistência cruzada aos inibidores da ALS são comumente observados (Burgos *et al.*, 2001; Christoffers *et al.*, 2006).

Em bactérias, três isoformas para ALS com diferentes propriedades, têm sido identificadas (Barak *et al.*, 1988; Eoyang & Silverman, 1988). Plantas superiores apresentam diferentes alelos para o gene da ALS de acordo com o nível de ploidia. Por exemplo, a diplóide *Arabidopsis thaliana* tem apenas uma única cópia constitutiva do gene da ALS (Mazur *et al.*, 1987) assim como a diplóide *Papaver rhoeas* (Scarabel *et al.*, 2004). Entretanto, *Brassica napus*, uma espécie alotetraplóide, possui um complexo multigene para ALS (Ouellet *et al.*, 1992). Esta espécie apresenta cinco alelos para ALS com as diferentes isoformas diferentemente reguladas. Fumo, algodão e girassol também têm sido relatados com diferentes isoformas para ALS (Keeler *et al.*, 1993; Grula *et al.*, 1995; Kolkman *et al.*, 2004).

2.4 Detecção da resistência

2.4.1 Diagnóstico

O diagnóstico da resistência de plantas daninhas aos herbicidas tem sido feito através de diferentes estudos (Vidal *et al.*, 2006). Ensaio realizados em casa de vegetação com curvas de dose-resposta sobre o crescimento de planta são clássicos para identificar ou confirmar casos de resistência aos herbicidas, observados a campo (Gazziero *et al.*, 1998; Vidal & Trezzi, 1999; Gazziero *et al.*, 2000).

Ensaio enzimáticos *in vivo* ou *in vitro* também têm sido amplamente realizados, visando comprovar a resistência aos herbicidas (Gerwich *et al.*, 1993; Singh & Shaner, 1998; Christoffoleti, 2000; Kuk *et al.*, 2003). Bioensaio

in vitro com a enzima ALS extraída de biótipos resistentes e suscetíveis de *Bidens pilosa* confirmaram a insensibilidade da enzima aos inibidores de ALS quando proveniente de plantas resistentes (Ponchio, 1997). Kuk *et al.* (2003) confirmaram a resistência de *Monochoria vaginalis* (Burm. f.) Kunth, uma importante planta daninha de lavouras de arroz na Coréia, aos herbicidas sulfoniulréias utilizando protocolos *in vivo* e *in vitro* para a análise da atividade da ALS.

Bioensaios *in vitro*, como aquele desenvolvido por Ray (1984), caracterizam-se por avaliar a atividade da ALS diretamente, extraindo a enzima e medindo sua atividade através do acúmulo de acetolactato, a qual resulta na formação de acetoína. Este método, embora trabalhoso, é bastante eficiente. Todavia, se o mecanismo de resistência for puramente metabólico, a planta não será controlada no campo, mas será diagnosticada como suscetível pelo bioensaio. Também, o aumento nos níveis de expressão da ALS, outro mecanismo de resistência, pode causar distorções nos resultados (Kuk *et al.*, 2003).

Protocolos *in vivo* são definidos como indiretos. Eles consistem da medição da atividade da enzima ALS na planta, através da aplicação do herbicida e posterior coleta de folhas, ou pela incubação de folhas com solução herbicida. Para ambos os procedimentos, posteriores análises são conduzidas. Um protocolo enzimático *in vivo* desenvolvido por Gerwich *et al.* (1993) e posteriormente modificado de acordo com a espécie daninha em questão, tem sido utilizado com sucesso na confirmação de casos de resistência (Christoffoleti, 2000; Burgos *et al.*, 2001; Kuk & Burgos, 2007). Usando este método, Gerwich *et al.* (1993) identificaram biótipos de carrapichão resistentes

aos inibidores da ALS. O protocolo baseia-se no uso do ácido ciclopropanodicarboxílico (CPCA), inibidor da enzima cetoácido reductoisomerase (KARI), a qual catalisa a reação seguinte a da enzima ALS na rota de síntese de aminoácidos. Na ausência de CPCA, KARI converte os substratos acetolactato e aceto-hidroxi butirato, resultantes da reação com a ALS em 2,3-di-hidroxi-isovalerato e 2,3-di-hidroxi-3-metilvalerato, respectivamente. Em plantas suscetíveis aos inibidores da ALS, quando CPCA é aplicado juntamente com o herbicida, não é observado o acúmulo de acetolactato, uma vez a ALS é inibida pelo herbicida. No entanto, em plantas resistentes, a ALS insensível promove a síntese de acetolactato que, por sua vez, acumula-se devido à inibição de KARI pelo CPCA. O acetolactato acumulado é convertido em acetoína através de método colorimétrico modificado e pode ser medido em leituras de absorvância conduzidas em espectrofotômetro.

2.4.2 Curvas de dose-resposta sobre crescimento de planta

Uma típica curva de dose-resposta de plantas a herbicidas apresenta forma sigmoideal (Seefeldt *et al.*, 1995). Dentro do modelo sigmoideal, equações não lineares como a log-logística, utilizam parâmetros que são biologicamente significativos quando aplicados à resposta da planta ao herbicida (Seefeldt *et al.*, 1995). Através destas, é possível estimar a dose responsável por controlar os biótipos em 50% (C_{50}) ou a dose que reduz em 50% o acúmulo de massa seca das plantas (GR_{50}) ou, ainda, a redução da atividade enzimática (I_{50}) em 50%.

Na literatura, em geral, a equação log-logística com quatro parâmetros tem sido amplamente utilizada em experimentos de dose-resposta a herbicidas (Streibig, 1988; Diebold *et al.*, 2003; Park & Mallory-Smith, 2004). De acordo com Seefeldt *et al.* (1995), o modelo log-logístico é o mais apropriado para estudos de dose-resposta. A equação utiliza como parâmetros “Y” = massa seca da parte aérea (percentagem do controle); “X”= dose herbicida (g ha^{-1}); “D” = a maior percentagem de massa seca da parte aérea obtida (assíntota de máxima); “C” = a menor percentagem de massa seca da parte aérea obtida (assíntota de mínima); “b” = a declividade; e “X₅₀” = dose estimada pelo modelo necessária para causar 50% de redução do valor da assíntota máxima (Seefeldt *et al.*, 1995).

Diversas equações também têm sido utilizadas, sem comprometer a magnitude da resposta das plantas ao herbicida. Curvas de dose-resposta aos inibidores da ALS foram geradas em ensaio realizado com a espécie *Monochoria vaginalis*, utilizando as equações log-logística e sigmoideal, com três parâmetros (Kuk *et al.*, 2003). Também, Dinelli *et al.* (2008), utilizaram a equação log-logística com três parâmetros para avaliar biótipos de *Conyza bonariensis* (L.) Cronq. (buva) resistentes ao glyphosate na Espanha. Equações exponenciais foram utilizadas para comparar biótipos de *B. subalternans* resistentes e suscetíveis aos inibidores da ALS (Gelmini *et al.*, 2002).

O fator de resistência (FR) é calculado dividindo-se o C₅₀, GR₅₀ ou I₅₀ do biótipo resistente pelo correspondente ao do biótipo suscetível, expressando o número de vezes em que a dose necessária para controlar 50% do biótipo resistente é superior à dose que controla 50% do biótipo suscetível (Hall *et al.*,

1998). Biótipo de *Monochoria vaginalis* apresentou FR >1600 e >300 para as sulfoniluréias imazosulfuron e pyrazosulfuron-ethyl, respectivamente (Kuk *et al.*, 2003). Biótipo de *Bidens pilosa* resistente aos inibidores de ALS apresentou FR equivalente a 9,90 e 27,03 para chlorimuron-ethyl e imazethapyr, respectivamente (Monquero *et al.*, 2003). Biótipos de *Amaranthus hybridus* demonstraram níveis de resistência que variaram de 60 a 3200 vezes a quatro famílias de inibidores de ALS, quando comparados ao biótipo suscetível (Whaley *et al.*, 2007).

2.5 A resistência aos herbicidas e valor adaptativo

O valor adaptativo de uma espécie corresponde à capacidade da mesma crescer, desenvolver-se e deixar descendentes férteis (Holt & Radosevich, 1983). No caso específico de plantas daninhas, o valor adaptativo também se associa à capacidade de infestação de determinada área.

Em geral, a resistência aos herbicidas não têm sido associada à redução do valor adaptativo dos biótipos resistentes. A exceção ocorre quando a resistência envolve herbicidas inibidores do FS2 (Warwick & Black, 1994). Especificamente neste caso, a mutação no gene *psbA* (proteína D1) resulta na alteração do aminoácido serina por glicina na posição 264, causando uma significativa redução na fixação do CO₂ e, conseqüentemente, redução na produção de biomassa e de sementes pelo biótipo resistente (Powles & Holtum, 1994), além de aumento da sensibilidade a elevadas temperaturas. A substituição reduz a afinidade do herbicida com o local “Qb” de ligação na proteína, mas também diminui a taxa de transferência de elétrons entre “Qa” e

“Qb”, comprometendo o aparato fotossintético e, conseqüentemente, afetando o valor adaptativo do biótipo resistente (Powles & Holtum, 1994).

Mutações conferindo resistência aos inibidores de ALS, de maneira geral, não têm sido associadas à redução do valor adaptativo, onde têm sido observados poucos efeitos no crescimento e desenvolvimento das plantas daninhas mutadas (Alcocer-Ruthling *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 1994; Monquero, 1999). Biótipos de *Kochia scoparia* resistentes e suscetíveis aos inibidores da ALS, não mostraram diferença significativa na produção de biomassa, no número de sementes produzidas ou na competitividade (Thompson *et al.*, 1994; Christoffoleti *et al.*, 1997). Biótipos de *Bidens* spp. demonstraram pequenas diferenças em curvas de crescimento comparativas, indicando que a resistência não reduziria o valor adaptativo dos biótipos resistentes (Monquero, 1999). Entretanto, biótipos suscetíveis de *Lactuca serriola* produziram 31% a mais de massa seca da parte aérea quando comparados àqueles resistentes aos inibidores de ALS, embora ambos tenham apresentado, ainda, competitividades similares (Alcocer-Ruthling *et al.*, 1992). A comparação entre biótipos de leiteira demonstrou a existência de variação no desenvolvimento dos mesmos, indicando superioridade em alguns parâmetros por determinado biótipo resistente, o que possivelmente lhe confere vantagens competitivas quando comparado com os demais biótipos (Vidal & Trezzi, 1999).

Estudos morfológicos e histológicos em seis populações de *Amaranthus powelli* S. Watson. sugerem que a mutação de triptofano para leucina (Trp₅₇₄Leu) no gene da ALS, responsável pela resistência aos herbicidas, causa efeitos pleiotrópicos no crescimento inicial e no desenvolvimento dos biótipos resistentes, afetando seu valor adaptativo (Tardif *et al.*, 2006). Biótipos

de *Digitaria ciliaris* (Retz.) Koeler (capim-colchão) resistente e suscetível aos inibidores da ACCase, apresentaram acúmulo de massa seca da parte aérea, crescimento absoluto e competição interespecífica semelhantes quando avaliados em experimento de série de substituição com a cultura da soja. A redução da massa seca pela cultura também foi similar na presença de ambos biótipos, o que sugere que tanto o resistente quanto o suscetível, possuem a mesma capacidade competitiva, a qual pode ser traduzida em semelhante adaptabilidade ecológica (López-Ovejero *et al.*, 2007).

Níveis elevados dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina foram observados em sementes de biótipos resistentes aos inibidores de ALS em *Kochia scoparia*, e correlacionados com velocidade de germinação superior destes biótipos em relação àquele suscetível, na condição de baixa temperatura (Dyer *et al.*, 1993). Eberlein *et al.* (1999) também constataram que os níveis destes aminoácidos foram 1,5 vez maiores em sementes de biótipo resistente de *Lactuca serriola* do que naquelas do suscetível. Ainda, os mesmos autores observaram maiores concentrações de valina e leucina em folhas do biótipo resistente quando comparado ao suscetível.

Níveis elevados de isoleucina e valina, ambos aminoácidos fundamentais para síntese de DNA (Rost *et al.*, 1990), poderiam permitir que a divisão e o crescimento celular ocorressem mais rapidamente no biótipo resistente do que no suscetível quando sob baixa temperatura (Dyer *et al.*, 1993). A consequência destas observações para a aptidão ecológica do biótipo resistente está na condição que uma rápida velocidade de emergência em relação ao biótipo suscetível, permitiria que o resistente ocupasse o nicho ecológico primeiramente, ganhando vantagem na competição por recursos do

meio. Além disto, a ausência de dormência controlada pela temperatura baixa no biótipo resistente em relação ao suscetível, permitiria ao resistente germinar nos mais adversos ambientes (Eberlein *et al.*, 1999).

2.6 *Bidens subalternans* e a resistência aos inibidores de ALS

Bidens subalternans, popularmente conhecida como picão-preto, pertence à família Asteraceae, tribo Heliantheae, e é uma espécie daninha tropical e subtropical (Ballard, 1986). Picão-preto pertence ao amplo complexo *Bidens* spp. composto por uma série de plantas anuais ou perenes, eretas ou decumbentes, raramente arbustos (Sherff, 1937; Ballard, 1986). De acordo com Sherff (1937), cerca de 280 espécies compõem o gênero *Bidens*, distribuídas entre a África e o novo mundo.

No Brasil, *B. subalternans* infesta a maioria das culturas anuais, com exceção da cultura do arroz irrigado (Kissman & Groth, 1999). Uma única planta de picão-preto pode produzir até 3000 sementes viáveis, o que demonstra seu grande potencial reprodutivo. *B. subalternans* é considerada uma das mais importantes plantas daninhas na soja. Infestações desta espécie daninha podem causar prejuízos da ordem de U\$ 200,00 ha⁻¹ na cultura da soja quando nenhum método de controle for adotado (Rizzardi *et al.*, 2003).

B. subalternans pode ser encontrada desde o Uruguai e a Argentina Central, até as regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil (Sherff, 1937). No Brasil ocorrem três variedades: var. *subalternans*, var. *simulans* e var. *unipinata* (Sherff, 1937). Apesar do comum confundimento no campo entre *B. subalternans* e *Bidens pilosa*, *B. subalternans* é tetraplóide (2n=48) e apresenta flores com sépalas amarelas; a maioria das cipselas apresenta quatro aristas.

B. pilosa é hexaplóide ($2n=72$) e apresenta dois tipos de morfologia de inflorescência: com flores radiadas e outra com flores apenas discóides (Grombone-Guaratini *et al.*, 2004; Mondin, 2004; Grombone-Guaratini *et al.*, 2006).

B. subalternans é uma espécie auto-compatível e não agamosperma (Grombone-Guaratini *et al.*, 2004). A espécie se caracteriza preferencialmente por autofecundação e antes mesmo da antese, o estigma bífido abre-se parcialmente e, já contém pólen em sua superfície (Grombone-Guaratini *et al.*, 2004). Fato semelhante já havia sido observado por Gillet & Lim (1975) e Sun & Ganders (1990) e, ainda, segundo os autores, esta é uma forma de assegurar a fecundação na ausência de polinizadores. A presença de insetos polinizadores em áreas com ocorrência de espécies de *Bidens* spp. tem sido observada, uma vez que as flores, em geral, apresentam características atrativas aos mesmos (Grombone-Guaratini *et al.*, 2004). Como consequência deste fato, pode haver influência na variabilidade genética em plantas auto-compatíveis e o número de flores visitadas por planta determinará a proporção de sementes que são formadas por fecundação cruzada (Schmitt, 1980; Maimoni-Rodella & Rodella, 1992). A fecundação cruzada através de polinizadores também pode promover a dispersão da resistência aos inibidores da ALS, através do fluxo gênico entre plantas resistentes e suscetíveis de picão-preto.

A importância agrícola desta espécie daninha aumentou nos últimos anos em função do aparecimento de biótipos resistentes aos herbicidas inibidores da ALS em todo o país (Monquero & Christoffoleti, 2001; Hernandez, 2004). Desde o primeiro caso registrado em 1996, no estado do Mato Grosso

do Sul, diversos novos casos foram identificados, mostrando que a resistência de *B. subalternans* aos inibidores de ALS encontra-se amplamente disseminada (Gelmini *et al.*, 2002; López-Ovejero *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2006).

2.7 Genética da resistência aos herbicidas em plantas daninhas

O surgimento e a disseminação da resistência aos herbicidas em uma população de plantas daninhas é um fenômeno evolutivo. A evolução ocorre como resposta das populações à ação da seleção natural, dependente da variabilidade genética inerente à população (Preston & Powles, 2002). A elevada variabilidade implica, diretamente, na capacidade de progresso genético, facilitando a seleção e o ajuste de indivíduos aos diferentes ambientes disponíveis (Allard, 1960). É necessário, portanto, variabilidade para que a seleção possa agir. Além da seleção natural, outras forças evolutivas costumam ocorrer como a mutação e a migração ou deriva genética, alterando as frequências gênicas numa população (Hartl & Clark, 1997).

Populações de plantas daninhas, em geral, apresentam elevada variabilidade genética entre plantas ou entre populações distintas e exibem, assim, potencial para se adaptar ao manejo realizado para o seu controle (Holt & Hochberg, 1997). Variabilidades genéticas elevadas foram estimadas entre biótipos resistente e suscetível aos inibidores da ALS em *Bidens spp.* do Rio Grande do Sul e do Paraná (Hernandes, 2004; Lamego *et al.*, 2005). Entretanto, fatores como deriva genética ou efeito fundador podem contribuir efetivamente para diminuir a variabilidade genética dentro de populações daninhas. Portanto,

o fato delas não serem melhoradas geneticamente como as plantas cultivadas, não lhes garante variabilidade infinita.

Há alguns fatores relacionados à população de plantas que interagem na resistência de plantas daninhas aos herbicidas: mutação, características reprodutivas da espécie e pressão de seleção imposta. A análise do efeito destas forças evolutivas sobre a resistência de plantas daninhas aos herbicidas determina a probabilidade de ocorrência e o tempo de evolução da resistência em uma população de plantas infestantes. A ocorrência de biótipos resistentes aos herbicidas em uma determinada área é considerada um fenômeno espontâneo decorrente da variabilidade genética natural que ocorre nas populações (Christoffoleti *et al.*, 1994). Neste caso, o herbicida age apenas como um selecionador dos indivíduos resistentes que se encontram presentes em baixa frequência.

Em uma população sensível de plantas daninhas, alelos para a resistência aos herbicidas podem existir, mesmo em baixíssimas frequências, ou surgir por novas mutações. Frequências iniciais de alelos para a resistência elevadas, da ordem de 10^{-6} a 10^{-4} , têm sido teorizadas para os inibidores de ALS (Stannard & Fay, 1987). Experimentos realizados com plantas de *Lolium rigidum* nunca antes aspergidas com inibidores da ALS demonstraram frequência inicial de indivíduos resistentes estimada em $2,2 \times 10^{-5}$ a $1,2 \times 10^{-4}$ à SU e de 1×10^{-5} a $5,8 \times 10^{-5}$ para IMI (Preston & Powles, 2002). Biótipos resistentes aos herbicidas SU foram identificados após apenas quatro a cinco anos de uso contínuo de herbicidas deste grupo (Mallory-Smith *et al.*, 1990).

Diversos estudos genéticos em biótipos resistentes aos herbicidas têm sido realizados (Vargas *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003; Merotto Jr., 2007).

Mutações na enzima ALS têm sido observadas como dominantes ou parcialmente dominantes, sendo a herança do gene nuclear (Tranel & Wright, 2002; Volenberg & Stoltenberg, 2002). A resistência aos inibidores da ALS em leiteira é controlada por um alelo nuclear dominante (Vargas *et al.*, 2001). Nas espécies daninhas *Lactuca* spp. e *Solanum nigrum* L., a resistência aos inibidores de ALS é controlada por um único gene nuclear, com dominância incompleta (Mallory-Smith *et al.*, 1990; Volenberg & Stoltenberg, 2002). Em *Monochoria korsakowii* a resistência aos inibidores da ALS é governada por um único gene nuclear dominante (Wang *et al.*, 2003). A resistência aos inibidores da ALS em biótipo de *Solanum ptychanthum* Dun. é controlada por um único gene, com dominância incompleta (Ashigh *et al.*, 2008).

A natureza poliplóide de algumas espécies daninhas também pode tornar a resistência mais complexa, pois, mutações específicas teriam a oportunidade de ocorrer em dois ou mais genomas (Christoffers, 1999). Para uma espécie daninha alopólípide, ou seja, formada a partir de duas espécies diplóides, a dispersão da resistência, uma vez dominante, não será tão rápida quanto para um autopolípide (originado a partir da duplicação do próprio genoma da espécie) devido aos alopólípidos possuírem na geração seguinte, frequência fenotípica semelhante a espécies diplóides, o que não ocorre com os autopolípides (Wang *et al.*, 2003).

2.8 Manejo da resistência

A elevada pressão de seleção imposta por práticas agrícolas para o controle das plantas daninhas contribui para uma rápida evolução das mesmas. Portanto, herbicidas atuam como agentes seletivos muito intensos e onde

existir variabilidade genética para resposta ao herbicida, a evolução da resistência será um resultado inevitável (Powles & Shaner, 2001).

Nos últimos anos, o cenário agrícola brasileiro tem sofrido modificações. Houve grande aumento no número de áreas cultivadas com soja transgênica, o que equivaleu a, pelo menos, um incremento de seis milhões de ha nos últimos cinco anos (Embrapa, 2008). A expansão da soja transgênica baseada apenas no uso de glyphosate acaba favorecendo outro tipo de pressão de seleção, reduzindo o impacto dos inibidores da ALS. Entretanto, em diversas áreas, especialmente na região centro-oeste, região com a maior produtividade em lavouras de soja do Brasil, há ainda o cultivo de lavouras de soja não transgênicas. Portanto, é necessário observar práticas de manejo que evitem a seleção e disseminação da resistência de plantas daninhas, como vem acontecendo com *B. subalternans* resistente aos inibidores de ALS.

A prática da rotação de culturas reduz o sucesso de plantas daninhas em sintonia com a espécie cultivada e permite o uso de herbicidas alternativos (Powles & Holtm, 1994). A rotação da soja com o milho, por exemplo, permite que infestações com plantas de *B. subalternans* resistentes aos inibidores de ALS possam ser controladas com o uso de herbicidas alternativos utilizados na cultura em rotação, como inibidores do FS2.

O manejo racional de herbicidas é prática relevante, observando que, produtos sem atividade residual no solo e com doses otimizadas, reduzem a pressão de seleção, diminuindo riscos. A rotação de herbicidas, com diferentes mecanismos de ação, também diminui consideravelmente a pressão imposta para a seleção de biótipos resistentes (Christoffoleti *et al.*, 1994). Para isso, é fundamental o conhecimento da área cultivada, ou seja, o histórico de uso da

lavoura, o que possibilita a identificação da evolução de populações de determinadas espécies, já que, normalmente, não é possível detectar os biótipos resistentes nos primeiros anos de ocorrência. Entretanto, não se pode esquecer das características do herbicida que lhe conferem ou não elevada pressão de seleção. Este é o caso dos inibidores de ALS onde, normalmente, a resistência tem sido observada após quatro a sete anos de consecutivas aplicações em uma mesma área (Sprague *et al.*, 1997).

A observação do nível de dano econômico, otimizando doses ou ainda o uso de práticas como cultivares com maior habilidade competitiva que dependam menos de herbicidas, podem contribuir para atrasar a evolução da resistência (Christoffoleti *et al.*, 1994; Vidal & Fleck, 1997; Lamego, 2004). Tradicionalmente, os agricultores esperam constatar em torno de 30% de plantas daninhas resistentes na área para que sejam tomadas medidas de controle. Entretanto, de acordo com a espécie daninha em questão, pode já ter havido um grande incremento no banco de sementes do solo, complicando o manejo. Vidal *et al.* (2006b) sugerem método para detecção precoce da resistência nas lavouras. Primeiramente, imagens de satélite ou fotos aéreas com alta definição acompanhadas de coordenadas de GPS, podem ser utilizadas para a localização de reboleiras ou plantas escapes ao controle realizado. Em seguida, coletam-se plantas que serão analisadas com testes rápidos de detecção da resistência ou ainda, sementes podem ser trazidas aos locais de pesquisa para análises adequadas. Comprovada a resistência, a área fica em quarentena e medidas alternativas devem ser tomadas, evitando a disseminação de sementes.

Portanto, fica claro que a adoção de manejo integrado de espécies daninhas, prática divulgada pelos pesquisadores da área da Herbologia, ainda é a melhor forma de prevenção para evitar o aparecimento de novos biótipos resistentes. Todavia, é necessário o trabalho cooperativo entre indústria, universidades, serviços de extensão e produtores rurais para que se evite problemas futuros com a evolução de novos casos de resistência.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem dos materiais

Sementes de *B. subalternans* suspeitas de resistência aos inibidores da ALS (R) foram colhidas em lavouras de soja, em propriedade localizada no município de Jataí – GO (17°52'32"S; 51°43'13"W), altitude de 700 m, região centro-oeste, no ano agrícola 2004/05. Nas lavouras da propriedade com plantas suspeitas de resistência, herbicidas inibidores da ALS têm sido aplicados há, pelo menos, dez anos consecutivos. A cultura predominante é a soja não transgênica. Entretanto, a rotação com algodão e milho é prática bastante comum. As sementes suscetíveis (S), utilizadas neste estudo, foram colhidas em área nunca antes aspergida com herbicidas, no município de Alecrim – RS (27°39'17"S; 54°45'56"W), altitude de 310 m, região sul, no ano de 2005.

3.2 Curvas de dose-resposta e ensaios enzimáticos

Experimentos de curvas de dose-resposta sobre o crescimento de planta e atividade *in vivo* da enzima ALS foram realizados para ambos os biótipos, buscando confirmar a resistência e identificar se havia, no biótipo suspeito, resistência cruzada aos inibidores da ALS pertencentes a diferentes grupos químicos.

3.2.1 Curvas de dose-resposta sobre crescimento de planta

Dois ensaios de curvas de dose-resposta sobre o crescimento de planta foram realizados na casa de vegetação do Laboratório de Flora Ruderal (LaFlor), localizado na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre – RS. O primeiro ensaio (Ensaio 1) foi conduzido de janeiro a março de 2006 e o segundo (Ensaio 2), de abril a junho de 2008.

Para ambos os ensaios foram utilizados vasos com capacidade volumétrica de 300 mL, preenchidos com mistura de solo e areia na proporção 3:1. O solo utilizado apresentou as seguintes características físico-químicas: argila 18%; pH 5,7 (em água); Índice SMP 6,5; P 100 mg L⁻¹; K 400 mg L⁻¹; Al 0,0 cmol_c L⁻¹; Ca 3,4 cmol_c L⁻¹; Mg 1,6 cmol_c L⁻¹; e, CTC efetiva 8,9 cmol_c L⁻¹. Uma planta foi estabelecida por vaso. As condições de crescimento do Ensaio 1 foram 30/25°C de temperatura do ar, com 14/10 h dia/noite regime de luz. Para o Ensaio 2, 25/20°C de temperatura do ar com 12/12 h dia/noite regime de luz. Os vasos foram colocados em bandejas plásticas contendo água, para manter o solo constantemente irrigado por capilaridade.

Os tratamentos foram dispostos em delineamento experimental completamente casualizado, com quatro repetições, organizados num esquema fatorial hierárquico. Para o Ensaio 1, ao fator A foram atribuídos os biótipos de picão-preto (S e R), ao fator B os herbicidas inibidores de ALS (chlorimuron-ethyl, imazethapyr, cloransulam-methyl e bispyribac-sodium) e ao fator C, as doses dos herbicidas (Tabela 1). As doses testadas para os biótipos S equivaleram às proporções 0,1/8, 1/6, 1/4, 1/2 e 1X a dose recomendada do

herbicida. Para o biótipo R, as proporções foram 0, 1/2, 1, 2, 4 e 8X a dose recomendada no rótulo do herbicida.

TABELA 1. Tratamentos herbicidas utilizados no ensaio de curva de dose-resposta (Ensaio 1) em biótipos de *Bidens subalternans* suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da enzima ALS. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2006.

Herbicidas				
	chlorimuron-ethyl ^a	imazethapyr ^b	cloransulam-methyl ^c	bispyribac-sodium ^d
Biótipos	Dose (g i.a. ha ⁻¹)			
S	0,0	0,0	0,0	0,0
	2,5	13,2	3,7	6,2
	3,3	18,0	5,0	8,3
	5,0	26,5	7,5	12,5
	10,0	53,0	15,0	25,0
	20,0	106,0	30,0	50,0
R	0,0	0,0	0,0	0,0
	10,0	53,0	15,0	25,0
	20,0	106,0	30,0	50,0
	40,0	212,0	60,0	100,0
	80,0	424,0	120,0	200,0
	160,0	848,0	240,0	400,0

^a Classic 250 DF (grânulos dispersíveis), DuPont.

^b Vezir 106 SC (solução concentrada), Milenia Agrociências.

^c Pacto 840 WG (grânulos dispersíveis em água), Dow Agrosiences.

^d Nominee 400 SC (solução concentrada), Iharabrás.

Para o Ensaio 2, ao fator A foram atribuídos os mesmos biótipos (S e R), ao fator B os herbicidas inibidores de ALS (chlorimuron-ethyl, imazethapyr, cloransulam-methyl e pyriithiobac-sodium) e ao fator C, as doses dos herbicidas (Tabela 2). As doses testadas para os biótipos S equivaleram às proporções 0, 1/16, 1/8, 1/4, 1/2, 3/4 e 1X a dose recomendada para o herbicida. Para o biótipo R, as proporções foram 0, 1, 2, 4, 16, 32 e 64X a dose recomendada do herbicida.

As doses estabelecidas para os biótipos S e R foram diferentes visando demonstrar com maior clareza a magnitude da resistência no R, uma vez que, para o S não há sentido em investigar dose herbicida de 64x àquela recomendada, por exemplo. Todos os tratamentos herbicidas foram acrescidos de surfactante: para chlorimuron-ethyl e imazethapyr adicionou-se Assist a

0,05% v/v; para cloransulam-methyl, Agral a 0,2% v/v e para bispyribac-sodium e pyriithiobac-sodium, Iharaguen-S a 0,25% v/v. Para ambos os experimentos, as aplicações dos herbicidas foram realizadas com pulverizador costal pressurizado com CO₂, munido com um bico tipo leque com ponta 110.02, aplicando-se volume de calda correspondente a 150 L ha⁻¹, pressão de trabalho de 200 kPa. O estágio das plântulas quando da aplicação dos herbicidas era de quatro a seis folhas e de duas a quatro folhas, para os Ensaio 1 e 2, respectivamente.

TABELA 2. Tratamentos herbicidas utilizados no ensaio de curva de dose-resposta (Ensaio 2) em biótipos de *Bidens subalternans* suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da enzima ALS. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008.

Biótipos	Herbicidas			
	chlorimuron-ethyl ^a	imazethapyr ^b	cloransulam-methyl ^c	pyriithiobac-sodium ^d
	Dose (g i.a. ha ⁻¹)			
S	0,0	0,0	0,0	0,0
	1,2	6,6	1,8	8,7
	2,5	13,2	3,7	17,5
	5,0	26,5	7,5	35,0
	10,0	53,0	15,0	70,0
	15,0	79,5	22,5	105,0
	20,0	106,0	30,0	140,0
R	0,0	0,0	0,0	0,0
	20,0	106,0	30,0	140,0
	40,0	212,0	60,0	280,0
	80,0	424,0	120,0	560,0
	160,0	1696,0	240,0	1120,0
	640,0	3392,0	960,0	4480,0
	1280,0	6784,0	1920,0	8960,0

^a Classic 250 DF (grânulos dispersíveis), DuPont.

^b Vezir 106 SC (solução concentrada), Milenia Agrociências.

^c Pacto 840 WG (grânulos dispersíveis em água), Dow Agrosiences.

^d Staple 280 CS (concentrado solúvel), Iharabrás.

A aplicação dos tratamentos herbicidas para o Ensaio 1 foi realizada na data de 31 de janeiro de 2006 e as condições ambientais na ocasião eram: umidade relativa do ar (URA) de 77%, temperatura do ar de 27°C e velocidade média do vento de 1,8 Km h⁻¹. Para o Ensaio 2, a aplicação ocorreu na data de

15 de maio de 2008 e as condições ambientais foram: URA de 85%, temperatura do ar de 25°C e ventos de 2,5 km h⁻¹.

Avaliações de controle dos biótipos foram realizadas aos 14 e 21 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT), para o Ensaio 1 e, aos 14, 21 e 28 DAT, para o Ensaio 2. O método utilizado foi o visual, o qual se constitui no uso de uma escala com notas de zero a 100, conforme o nível de injúria ocasionado pelo herbicida às plantas. A nota zero equivale à ausência de injúrias enquanto a nota 100 equivale à morte da planta. Aos 28 DAT, para o Ensaio 2, a parte aérea das plantas foi coletada e colocada para secar em estufa a 60°C por 72h, quando a massa seca da parte aérea (MSPA) dos biótipos foi determinada.

3.2.2 Ensaio enzimático *in vivo*

Sementes dos biótipos S e R foram pré-germinadas em bandejas com volume de 4 L, preenchidas com a mistura comercial de substrato (“Sunshine Mix”, EUA) e mantidas em casa de vegetação na University of Arkansas, Fayetteville, AR, EUA, durante os meses de agosto a outubro de 2007. Após a emergência, plântulas individuais foram transplantadas para vasos com capacidade de 500 mL, preenchidos com a mesma mistura comercial de substrato. As condições de crescimento foram 30/25°C de temperatura do ar, com 14/10 h dia/noite de regime de luz.

A inibição causada pelos herbicidas inibidores da ALS *in vivo* em biótipos de *B. subalternans* foi avaliada usando um protocolo adaptado de Gerwich *et al.* (1993), no Weed Physiology Laboratory, University of Arkansas, EUA, em 2007. Os tratamentos foram dispostos em delineamento experimental

completamente casualizado, com três repetições, sendo os ensaios repetidos duas vezes. Os tratamentos herbicidas avaliados, com as respectivas doses são encontrados na Tabela 3. Todos os tratamentos foram acrescidos do surfactante não-iônico AG-98 a 0,25% v/v.

TABELA 3. Tratamentos herbicidas utilizados nos ensaios da enzima ALS *in vivo* de biótipos de *Bidens subalternans* suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da enzima ALS. University of Arkansas, Fayetteville – AR, 2007.

Herbicidas				
	chlorimuron-ethyl ^a	imazethapyr ^b	cloransulam-methyl ^c	pyrithiobac-sodium ^d
Biótipos	Dose (g i.a. ha ⁻¹)			
S	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,01	0,50	0,15	0,70
	0,10	2,50	0,75	3,50
	0,50	5,00	1,50	7,00
	1,00	25,00	7,50	35,00
	10,00	50,00	15,00	70,00
	20,00	100,00	30,00	140,00
R	0,00	0,00	0,00	0,00
	1,00	25,00	15,00	70,00
	5,00	50,00	30,00	140,00
	10,00	100,00	60,00	350,00
	50,00	250,00	120,00	700,00
	100,00	500,00	750,00	3500,00
	1000,00	5000,00	1500,00	7000,00

^a Classic DF (grânulos dispersíveis), DuPont.

^b Pursuit SC (solução concentrada), BASF.

^c FirstRate WDG (grânulos dispersíveis em água), Dow Agrosiences.

^d Staple SC (solução concentrada), DuPont.

Os herbicidas foram aspergidos utilizando-se uma câmara de aspersão, equipada com três bicos tipo leque com ponta 110.02, aplicando-se volume de calda correspondente a 200 L ha⁻¹, pressão de trabalho de 200 kPa, quando as plântulas encontravam-se em estágio de duas a quatro folhas.

Três horas após a aplicação dos herbicidas, as plantas foram aspergidas com 960 g ha⁻¹ de ácido ciclopropanodicarboxílico (CPCA), utilizando aspersor manual, de acordo com protocolo adaptado de Gerwich *et al.* (1993). A atividade da enzima ALS foi avaliada 6 h após a aplicação dos tratamentos herbicidas, através da quantificação de níveis de acetoína acumulada. Para

isso, 0,4 g de tecido jovem foi colhido e cortado em pedaços de 2 a 4 mm. O tecido cortado foi então colocado em gral e homogeneizado com 6 mL da solução 0,25% v/v do surfactante não-iônico AG-98, com ajuda de um pistilo. Após, o material homogeneizado foi filtrado usando filtro GF/C (Whatman). Amostras de 3 mL foram separadas e acondicionadas em tubos plásticos. Cinquenta μL de H_2SO_4 6 N foi adicionado a cada tubo e agitado com vortex. A mistura foi então aquecida a 60°C em agitador (*Environ Shaker*, Lab-Line) por 30 min, para descarboxilação de acetolactato em acetoína.

Níveis de acetoína foram determinados através de método colorimétrico modificado (Gerwich *et al.*, 1993). Um mL da solução creatina 0,09% w/v + naphтол 0,9% w/v (em 2,5 N de NaOH) preparada fresca, foi adicionada a cada tubo. A mistura foi agitada e aquecida novamente no agitador a 60°C por 30 min, para desenvolvimento de cor. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 15850 g por 5 min. Cuidadosamente, o sobrenadante formado em cada tubo foi removido e transferido para um novo tubo. O sobrenadante foi então resfriado à temperatura ambiente e após, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro (BioSpec-1601, Shimadzu) a 530 nm. Os dados foram expressos como porcentagem das plantas não tratadas com herbicidas.

3.2.3 Análise estatística

Os ensaios enzimáticos foram conduzidos duas vezes para cada herbicida e cada biótipo, com três repetições cada vez. Não havendo interação entre os tratamentos herbicidas e experimento, os dados foram agrupados e analisados como um único experimento com seis repetições.

Os dados coletados nos experimentos de dose-resposta sobre crescimento de planta e nos ensaios enzimáticos *in vivo* foram analisados quanto à homocedasticidade, sendo que para a variável MSPA, houve necessidade de transformação dos dados por raiz(X). Posteriormente, procedeu-se à análise de variância através do teste F, adotando-se como limites de aceitação de significância o nível de 5% de probabilidade, tanto para efeitos individuais dos fatores como para efeitos de interação. Os dados foram analisados utilizando o programa SAS (SAS, 1989).

As médias dos tratamentos foram comparadas aplicando-se o teste da Diferença Mínima Significativa (DMS), a 5% de probabilidade do erro experimental e os dados foram ajustados inicialmente para equação log-logística ou sigmoidal de quatro parâmetros, mas como a assíntota de mínima não foi significativa, adotaram-se curvas de dose-resposta usando as funções log-logística (Equação 1) e sigmóide (Equação 2) de três parâmetros, através do programa Sigma Plot versão 10.0:

$$Y = \frac{a}{1 + (X/X_{a50})^b} \quad \text{Equação 1}$$

onde: Y = variável dependente (controle, ou MSPA ou atividade da enzima ALS (%)); X = variável independente (dose herbicida (g ha^{-1})); a = assíntota de máxima; b = declividade da curva; X_{a50} = dose herbicida (g ha^{-1}) responsável por reduzir a variável dependente ao nível correspondente a 50% do valor da assíntota de máxima (a). Foi calculado, pela equação com os respectivos coeficientes, o valor de X_{50} , ou seja, o valor da dose responsável por reduzir

50% do controle (C_{50}), ou reduzir 50% a MSPA dos biótipos (GR_{50}), ou reduzir em 50% a atividade da enzima ALS (I_{50}).

$$Y = \frac{a}{1 + \exp^{-(X-Xa_{50})/b}} \quad \text{Equação 2}$$

onde: Y = variável dependente (controle, ou MSPA ou atividade da enzima ALS (%)); X = variável independente (dose herbicida ($g\ ha^{-1}$)); a = diferença entre as assíntotas de máxima e mínima; b = declividade da curva; Xa_{50} = dose herbicida ($g\ ha^{-1}$) responsável por reduzir a variável dependente ao nível correspondente a 50% do valor da assíntota de máxima (a). Foi calculado, pela equação com os respectivos coeficientes, o valor de X_{50} , ou seja, o valor da dose responsável por reduzir 50% do controle (C_{50}), ou reduzir 50% a MSPA dos biótipos (GR_{50}), ou reduzir em 50% a atividade da enzima ALS (I_{50}). O fator de resistência (FR) foi calculado através de $C_{50}R/C_{50}S$, $GR_{50}R/GR_{50}S$ e $I_{50}R/I_{50}S$.

3.3 Seqüenciamento do gene da ALS

3.3.1 Extração do DNA

Plântulas dos biótipos S e R, foram germinadas em bandejas e mantidas em casa de vegetação na University of Arkansas, em 2007 (conforme descrito no item 3.2.2), para extração de DNA. O DNA genômico foi extraído a partir de plantas individuais, usando protocolo CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) modificado (Doyle & Doyle, 1987).

Folhas de tecidos jovens foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e acondicionadas em microtubos previamente resfriados. Quinhentos μL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl [pH 8,0], 20 mM EDTA [pH 8,0], 2 M NaCl, 2% CTAB, 2% PVP-40, 1 mM phenanthroline e 0,3% β -mercaptoetanol) foram adicionados a cada tubo e esses agitados vigorosamente. Após, os tubos foram incubados a 55°C por 45 min em banho-maria. Em seguida, 500 μL da mistura clorofórmio:fenol:álcool isoamílico (25:24:1) foram adicionados a cada tubo, misturado e centrifugado a 12.000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e 500 μL de álcool isopropil foram adicionados e os tubos incubados a -80°C por 12 h. Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 10 min a 12.000 rpm, 4°C e, o sobrenadante descartado. O *pellet* foi lavado com etanol absoluto e seco em concentrador a vácuo (*Vaccufuge*, Eppendorf), durante 10 min à 45°C. O DNA foi ressuspenso com 30 μL de água ultrapura, quantificado utilizando fluorômetro (*DynaQuant*, Hoefer Scientific) e diluído a 20 ng μL^{-1} .

3.3.2 Desenho de *primers*

O gene da enzima ALS possui cinco domínios altamente conservados denominados C, A, D, B, E, com uma região intermediária entre C, A, D e B, E (Tranel *et al.*, 2002). *Primers* sobrepostos foram desenhados com o auxílio do programa Sequencher (versão 4.8), para amplificar separadamente o gene da ALS em *B. subalternans*, em três partes: Região 1 (correspondente aos domínios C, A e D); Região 2 (intervalo entre os domínios) e, Região 3 (domínios B e E) (Tabela 4). Inicialmente, seqüências do gene da ALS de *B. pilosa* (acessos [AJ514934](#) e AJ514936) depositadas no GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) foram utilizadas como base para o desenho de *primers* para amplificação do gene da ALS em *B. subalternans*. Entretanto, apenas os *primers* correspondentes à Região 3 produziram *amplicons* em *B. subalternans*. Deste modo, *primers* denegerados utilizados por Prado *et al.* (2004) foram testados para amplificação da Região 1. Após testes iniciais e obtidos os *amplicons* desejados, *primers* específicos foram desenhados para amplificação do gene da ALS (Figura 1).

TABELA 4. *Primers* usados para amplificação do gene da enzima acetolactato sintase (ALS) em *Bidens subalternans*.

Região ^a	<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	<i>Amplicon</i> (pb)	Pareamento (°C) ^b
1	1_F	AACGCGAAGGCGTCACCCACGTCTT	700	61
	1_R	GCCCCATCAAAGTACTAGCAACCGG		
2	2_F	CCGGTTGCTAGTACTTTGATGGGGC	550	61
	2_R	CCACCCGAAGTCAACCATTGTCTCG		
3	3_F	CGGCCAGTTTTATAAATATAATAA	490	Touchdown
	3_R	CACCCGCCYGGAATCATCGGCRAAC		
3	4_F	CTGCTCAGTTTTACAAGTATAACAAACC	515	Touchdown
	4_R	CCTTCGGTRATSACATCCYTGAAGCC		

^a Regiões 1, 2 e 3 correspondem, respectivamente, à amplificação dos domínios C, A, D; região intermediária e domínios B,E.

^b Programação da reação em *touchdown* com temperaturas de pareamento variando entre 60°C e 48°C.

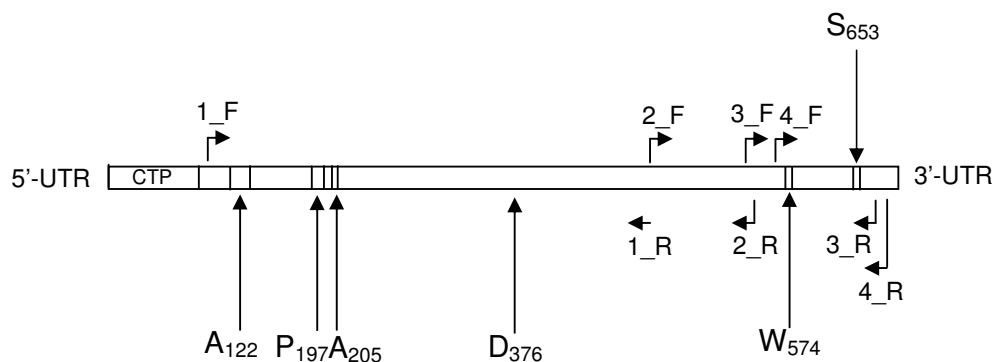


FIGURA 1. Representação esquemática do gene da enzima ALS e *primers* usados para sua amplificação. *Primers* numerados de acordo com a Tabela 4. CTP = peptídeo de trânsito para o cloroplasto. Linhas verticais indicam pontos variáveis que indicam resistência aos herbicidas inibidores da ALS conferindo substituição de aminoácidos em plantas daninhas (A=alanina; D=aspartato; P=prolina; S=serina; W=triptofano). Números após os aminoácidos indicam a posição no gene de acordo com a sequência de *Arabidopsis thaliana*.

3.3.3 Amplificação das regiões do gene da ALS e clonagem

Taq DNA polimerase Hotstar (Qiagen) foi usada para amplificar o gene da ALS em três reações de cadeia de polimerase (PCR). A reação de PCR realizada em termociclador PTC100 MJ Research, consistiu de 20 ng de DNA genômico, 10 μ M de cada primer, 1x PCR buffer, 1x Q-solution, 500 μ M dNTPs, 2,5 U de Hotstar Taq e água miliQ em um volume total de 20 μ l. O protocolo de reação, com exceção da reação utilizando programação em *touchdown*, consistiu de 15 min de incubação a 95°C, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30s para desnaturação da fita de DNA; 61°C por 1 min, para o pareamento dos primers; 72°C por 30s para extensão da fita de DNA e um ciclo de extensão final de 72°C por 5 min. Para a reação em *touchdown*, utilizou-se 15 min de incubação a 95°C, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30s para a desnaturação da dupla fita; 60°C a 48°C (reduzindo a cada 2°C) por 1 min, para o pareamento dos *primers*; 72°C por 30s para extensão da fita de DNA e, um ciclo de extensão final de 72°C por 5 min.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 0,8%, contendo 0,8 μ l de brometo de etídio (10 mg mL⁻¹). Os produtos de PCR foram purificados usando QiaQuick PCR Products Kit (Qiagen) e clonados utilizando TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen). A clonagem consiste na ligação do produto da amplificação contendo o DNA de interesse em uma molécula circular de DNA vetor, o plasmídeo. A mistura de DNA recombinante é usada para transformar células bacterianas, as quais crescem em colônias para multiplicação. Cada colônia individual contém uma população de inserções idênticas de DNA, os clones (Griffith *et al.*, 2002). Clones positivos (com DNA recombinado) são selecionados e sequenciados. Deste modo, os segmentos

dos alelos para ALS podem ser isolados e identificados após seqüenciados com sucesso, uma vez que, moléculas de DNA recombinante individuais (cada alelo) entram em hospedeiros bacterianos individuais.

Estirpes de *Escherichia coli* TOP10 foram transformadas com vetor plasmídio contendo os produtos de PCR e plaqueados em meio Luria-Bertani broth (LB) mais agar, contendo 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ X-gal. As placas foram incubadas por 12h a 37°C e colônias positivas foram selecionadas e crescidas por 12h em meio LB contendo 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina, mantidos em constante agitação, a 37°C. O DNA do plasmídio foi extraído usando protocolo Mini-Prep (Engebrecht *et al.*, 2003) e analisado em gel de agarose 0,8%, para verificar a presença do fragmento.

O DNA plasmidial foi quantificado em fluorômetro e o fragmento foi seqüenciado utilizando-se os *primers* universais M13F e M13R, flanqueadores da região de múltiplos locais de clonagem. O seqüenciamento foi realizado no DNA Resource Center of the University of Arkansas, EUA, utilizando o seqüenciador ABI 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Três plantas de cada biótipo S e R foram utilizadas para amplificação das três regiões do gene da ALS em *B. subalternans*. As seqüências foram obtidas de, pelo menos, seis clones e utilizadas para a construção da seqüência gênica. Os pares de *primers* desenhados para amplificação da Região 3 do gene da ALS foram utilizados no seqüenciamento direto do gene, sem clonagem.

3.3.4 Amplificação do gene completo da ALS

Nova extração de DNA genômico dos biótipos S e R de *B. subalternans* foi realizada no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Plantas de

Lavoura da Faculdade de Agronomia, UFRGS, em 2008, conforme citado no item 3.3.1. Dois novos *primers* forward foram desenhados para a amplificação do gene inteiro da ALS nos diferentes alelos de *B.subalternans*, baseados nas seqüências separadas do gene, previamente amplificadas:

5_F (5'-AGCGAAGGCGTCACCCACGTCTTAG-3')

6_F (5-CCGGAATCCCCGTAAGCTCCACAAA-3')

Os pares 5_F e 6_F foram testados com os *primers* 3_R e 4_R (Tabela 4) para amplificação de um fragmento único do gene ALS. A reação de PCR consistiu de 40 ng de DNA genômico, 0,4 µM de cada primer, 1x PCR buffer, 2 mM MgSO₄, 0,2 mM dNTPs, 1 U Platinum Taq (Invitrogen) e água miliQ em um volume total de 50 µl. Em termociclador PTC100 MJ Research, a reação consistiu de 1 min de incubação a 94°C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30s para desnaturação da fita de DNA; 57°C-60°C por 60s, para o pareamento dos *primers*; 68°C por 1min para extensão da fita de DNA e um ciclo de extensão final de 68°C por 5 min.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 0,8%, contendo 0,8 µl de brometo de etídio (10 mg mL⁻¹). Os produtos de PCR foram purificados usando GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences) e seqüenciados no Laboratório ACTGene, Centro de Biotecnologia da UFRGS, Porto Alegre – RS, utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

3.3.5 Análise das seqüências amplificadas

As seqüências do gene da ALS obtidas em todas as etapas foram analisadas para a presença de mutações usando o programa Sequencher e

BioEdit (versão 7.0.9.0) e comparadas com seqüências previamente depositadas no GenBank usando BLASTn e BLASTx. Para o alinhamento das seqüências utilizou-se ClustalW 1.82 (<http://www.ebi.ac.uk/clustaw>).

3.4 Southern Blot

Um experimento *Southern Blot* com P³² foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecido e Transformação do Departamento de Horticultura da University of Arkansas, em 2007. DNA genômico foi extraído de ambos os biótipos, S e R, conforme citado no item 3.3.1. Análises da freqüência de corte de enzimas de restrição em seqüências do gene da ALS de *B. subalternans* previamente amplificadas, foram realizadas com o auxílio do programa BioEdit. Posteriormente, as enzimas endonucleases BamHI, HindIII, EcoRI and EcoRV foram utilizadas para digestão do DNA.

3.4.1 Digestão do DNA

Para a digestão, 2,5 µg de DNA de cada biótipo (S e R), 20 µl *buffer* 10X, 10 U enzima e água ultrapura foram adicionados em microtubos e incubados por 12h à temperatura de 37°C. No dia seguinte, 5 µl de RNaseA (10 mg mL⁻¹) foram adicionados e procedeu-se à nova incubação por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, 20 µl NaOAc 3M pH 5,0 e 400 µl de etanol 95% gelado foram acrescentados à cada tudo e esses centrifugados a 13 rpm, por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol 70% e seco. Após secagem, o DNA foi ressuspenso em 30 µl de água ultrapura.

3.4.2 Preparo da membrana e hibridização

Os fragmentos de DNA genômico de ambos os biótipos foram separados em gel de agarose a 0,8% em tampão TAE. Em seguida, o gel foi colocado em solução de desnaturação composta de NaCl e NaOH por 30 min, em leve agitação, sendo a solução substituída por solução fresca após 15 min. Concluída a desnaturação, o gel foi colocado em solução de neutralização composta de Tris e NaCl pH 7,4, por 30 min, em agitação leve. Os fragmentos de DNA presentes no gel foram então transferidos para membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham Biosciences) por capilaridade, através de transferência alcalina por aproximadamente 15 h. A seguir, a membrana foi seca em forno de hibridização por 20 min à temperatura de 65°C, logo após sendo armazenada em freezer a -20°C, até o momento da hibridização.

Um fragmento de 700 pb correspondente às regiões C, A, D (Região 1) do gene da ALS em *B. subalternans* foi amplificado e purificado, conforme citado anteriormente, para ser utilizado como sonda. O preparo da sonda foi realizado de acordo com Prim-A-Gene Kit (Promega), utilizando água livre de nuclease, tampão 5X para marcação, dNTPs não marcados, DNA desnaturado, BSA livre de nuclease, *Klenow* e P³². A solução foi mantida em temperatura ambiente por 1h.

Para a hibridização, inicialmente a membrana foi colocada em solução de pré-hibridização composta de água, SDS 20%, SSC 20X e Denhardt's Soln (50X), acrescida de 100 µl de esperma de salmão, em forno de hibridização à 65°C, em rotação moderada por 2h. Em seguida, procedeu-se à purificação da sonda e verificação de sua eficiência com a ajuda de um contador "Geiger". A

sonda foi adicionada à solução de hibridização, contendo a membrana, mantida em rotação moderada, durante a noite até o dia seguinte.

Após a hibridização, a membrana foi lavada três vezes, primeiramente em solução SSC 2x (cloreto de sódio e citrato de sódio) + SDS 0,5X. Em seguida, SSC 1X + SDS 0,25X e, por último SDS 0,125X + SSC 0,5x, a 65°C por 15 min. A membrana marcada com P³² foi envolvida em parafilme e exposta em cassete por até 2 dias, quando foi analisada por autoradiografia.

3.5 Comparação de valores adaptativos

3.5.1 Crescimento relativo

Dois experimentos foram conduzidos para comparação do crescimento relativo entre os biótipos S e R de *B. subalternans*. O primeiro experimento foi conduzido na casa de vegetação da University of Arkansas, de maio a julho de 2007. Sementes de ambos os biótipos foram semeadas em bandejas contendo a mistura de solo comercial (Sunshine Mix, EUA). Após a emergência, as plântulas foram transplantadas para vasos de 4L, preenchidos com a mesma mistura comercial, estabelecendo-se uma planta de cada biótipo por vaso. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação a 30/25°C de temperatura com 14/10h dia/noite de regime de luz. Vinte dias após a emergência (DAE), os vasos foram colocados fora da casa de vegetação, em condições semelhantes de crescimento.

A partir de 20 DAE, a estatura de planta foi determinada e as partes aéreas e de raízes, de ambos os biótipos, foram colhidas e secas por 72h a 60°C, para determinação da MSPA, massa seca de raízes (MSR) e massa seca total (MST). As coletas foram realizadas semanalmente, até o

florescimento dos biótipos. A relação parte aérea/raízes foi determinada, bem como a taxa de crescimento relativo (TCR), calculada de acordo com a Equação 3 (Radosevich *et al.*, 1997):

$$\text{TCR} = (1/M_i) * (dM/dt) \quad \text{Equação 3}$$

onde M_i = massa seca total inicial (mg planta^{-1}), dM = incremento de massa seca no intervalo de 7 dias (mg planta^{-1}) e dt = intervalo de tempo adotado (7 dias). Ao final do experimento, sementes de ambos os biótipos foram colhidas para posterior avaliação do valor adaptativo.

O segundo experimento foi conduzido na casa de vegetação do LaFlor, UFRGS, de abril a junho de 2008. Sementes de ambos os biótipos foram semeadas em bandejas contendo mistura de solo comercial (Primavera, Viamão-RS). Após a emergência, as plântulas foram transplantadas para vasos com capacidade de 4L, preenchidos com a mesma mistura de solo e areia, estabelecendo-se uma planta de cada biótipo por vaso. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação a 25/20°C de temperatura com 12/12h dia/noite de regime de luz. As determinações realizadas neste experimento foram semelhantes às aquelas realizadas para o experimento citado acima.

O delineamento experimental para ambos os experimentos foi o completamente casualizado, com quatro repetições, num esquema fatorial. O fator A consistiu dos biótipos (S e R) e o fator B, das épocas de determinações (coleta das partes aérea e de raízes e medição da estatura, semanalmente até o florescimento dos biótipos).

3.5.2 Germinação das sementes

Dois experimentos foram conduzidos para avaliar a viabilidade de sementes e comparar o valor adaptativo entre os biótipos S e R de *B. subalternans*. O primeiro foi conduzido na University of Arkansas, EUA, nos meses de outubro e novembro de 2007. Este experimento foi repetido duas vezes. Inicialmente, foi determinado o peso de 100 sementes de cada biótipo, colhidas no experimento de crescimento relativo (item 3.5.1).

Sementes dos biótipos S e R foram postas em solução com hipoclorito de sódio 30% da solução de 5% por 5min, para desinfestação. Em seguida, 25 sementes de cada biótipo foram colocadas em placa de Petri, com papel germinador e 4 mL de água destilada em câmara climatizada de crescimento vegetal (CCCV). As condições foram 28/25°C de temperatura, com 12/12h de regime de luz. A germinação das sementes foi avaliada a cada dois dias até o décimo quarto dia. As sementes foram consideradas germinadas quando a radícula apresentava 0,5 cm de comprimento. O delineamento experimental foi completamente casualizado com quatro repetições, em esquema fatorial, onde ao Fator A foram atribuídos os biótipos S e R e, ao Fator B, tempo em dias de contagem da germinação (2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias).

O segundo experimento foi conduzido no LaFlor da UFRGS no mês de julho de 2008. As condições de preparo das sementes foram semelhantes àquelas descritas acima. Conjuntos de quatro placas de Petri por biótipo foram colocados em CCCV com temperatura constante e fotoperíodo de 12h de luz fluorescente. O arranjo dos tratamentos seguiu modelo fatorial, sendo avaliados os fatores: biótipos (S e R); tempo em dias de contagem da germinação (2, 4, 7, 9, 11 e 14 dias) e temperatura (15°C, 20°C, 25°C, 30°C e

35°C). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, contendo quatro repetições. O número de sementes germinadas foi contado a cada intervalo de 2 dias até 14 dias após o início do experimento. Amostras de sementes dos dois biótipos foram enviadas para o Laboratório de Análises Micotoxicológicas, Santa Maria – RS, para quantificação dos teores de aminoácidos totais pelo método de cromatografia líquida de alta performance (HPLC-LCMS/MS).

3.5.3 Análise estatística

Os dados coletados nos experimentos de crescimento relativo e de germinação das sementes foram analisados quanto à homocedasticidade. Para o experimento de crescimento relativo, houve necessidade de transformação dos dados por logaritmo neperiano de (X), para as variáveis MSPA, MSR e MST, no primeiro experimento; no segundo experimento, todas as variáveis avaliadas (estatura de planta, MSPA, MSR, MST e relação massa seca da parte aérea e de raízes) foram transformadas, utilizando logaritmo neperiano de (X).

Para o primeiro experimento de germinação das sementes, não havendo significância para o teste “t” entre as duas repetições do experimento, os dados foram agrupados e considerados como um único experimento, com oito repetições. As variáveis TCR e peso de sementes foram comparadas entre os biótipos através do teste “t”, ao nível de 5% de probabilidade. Procedeu-se à análise de variância através do teste F, adotando-se como limites de aceitação de significância o nível de 5% de probabilidade, tanto para efeitos individuais dos fatores como para efeitos de interação. As médias dos tratamentos foram

comparadas aplicando-se o teste da Diferença Mínima Significativa (DMS), a 5% de probabilidade do erro experimental, quando necessário. Os dados foram analisados utilizando o programa SAS (SAS, 1989).

No experimento de germinação, as seguintes variáveis foram determinadas: tempo médio de germinação em dias (MLIT), de acordo com a Equação 4 (Czabator (1962) apud Ranal & Santana (2006)):

$$MLIT = (G_1 * T_1 + \dots + G_n * T_n) / (G_1 + \dots + G_n) \quad \text{Equação 4}$$

onde G_1 equivale ao número de sementes germinadas no primeiro dia; G_n = número de sementes germinadas (não acumuladas) no dia n ; T_1 = primeiro dia de contagem; T_n = contagem realizada no dia n ; taxa de germinação (semente/dia) (TG); de acordo com Maguire (1962) apud Ranal & Santana (2006):

$$TG = (G_1 / T_1 + \dots + G_n / T_n) \quad \text{Equação 5}$$

cujos parâmetros correspondem aos mesmos já descritos para a Equação 4; e, por último, o coeficiente de velocidade de germinação em % (CVG) de Kotowski (1926) apud Ranal & Santana (2006), conforme Equação 6:

$$CVG = 100 / MLIT \quad \text{Equação 6}$$

Os dados referentes à estatura de planta, MSPA, MSR, MST e relação massa seca da parte aérea e de raízes foram ajustados ao modelo exponencial

de dois parâmetros, através do programa Sigma Plot versão 10.0, de acordo com a Equação 7:

$$Y = a \cdot \exp^{(b \cdot X)} \quad \text{Equação 7}$$

onde: Y = estatura de planta (cm), MSPA (mg planta⁻¹), MSR (mg planta⁻¹), MST (mg planta⁻¹) ou relação massa seca da parte aérea e de raízes; a = assíntota máxima; b = parâmetro do modelo; X = dias após a emergência.

Os dados referentes à germinação das sementes dos biótipos S e R foram ajustados ao modelo log-logístico de três parâmetros, através do programa Sigma Plot versão 10.0, de acordo com a Equação 8:

$$Y = \frac{a}{1 + (X/X_{a50})^b} \quad \text{Equação 8}$$

onde: Y = sementes germinadas (%); X = tempo (dias); a = assíntota de máxima; b = declividade da curva; X_{a50} = dias necessários para a variável dependente obter 50% do valor da assíntota de máxima (a). Foi calculado, pela equação com os respectivos coeficientes, o valor de X₆₀, ou seja, dias necessários para 60% das sementes germinarem.

3.5.4 Série de substituição

Foram conduzidos dois experimentos em casa de vegetação da University of Arkansas, EUA, de setembro a dezembro de 2007. O primeiro experimento com monocultivo de *B. subalternans*, objetivou determinar a população de plantas m⁻² a partir da qual a MSPA por unidade de área (g m⁻²)

torna-se independente da população, de acordo com a “lei de produção final constante” (Radosevich *et al.*, 1997) sugerido por Rigoli *et al.* (2008).

As populações estabelecidas para serem testadas foram 2, 4, 8, 16, 32 e 64 plantas por vaso (equivalentes a 25, 50, 100, 200, 400 e 800 plantas m^{-2}). O delineamento experimental foi completamente casualizado, com quatro repetições, utilizando-se sementes do biótipo S. As sementes foram semeadas em vasos com capacidade de 6L e área de 774,7 cm^2 (25,4 x 30,5 cm), preenchidos com mistura comercial (Sunshine Mix, EUA). A MSPA foi analisada 42 DAE. Na análise dos dados, utilizou-se a produção recíproca para determinar a população de plantas onde a MSPA se tornava constante. Tal população foi de 150 plantas m^{-2} .

O segundo experimento foi conduzido em série de substituição e instalado de forma semelhante, com 12 plantas por vaso (150 plantas m^{-2}), determinado pelo primeiro experimento. Os tratamentos foram dispostos em delineamento completamente casualizado, com quatro repetições. As proporções entre as plantas dos biótipos S e R foram 12:0 (estande puro do biótipo S), 9:3, 6:6, 3:9 e 0:12 (estande puro do biótipo R). As unidades experimentais foram semelhantes àquelas já descritas para o experimento 1. A semeadura foi realizada na densidade superior às populações desejadas em cada tratamento e aos 15 DAE, efetuou-se o desbaste para retirada das plantas excedentes (Figura 2).

Aos 42 DAE, a MSPA foi determinada pela pesagem da parte aérea das plantas, após serem secas em estufa por 72h, a 60°C. Para a análise, utilizou-se o método da análise gráfica de produtividade relativa (Radosevich, 1987). De acordo com este procedimento, é construído um diagrama com base na

produtividade relativa (PR) e na produtividade relativa total (PRT), nas proporções das plantas de 0, 25, 50, 75 e 100% dos biótipos S e R. As produções relativas para cada biótipo foram calculadas a partir da produção de cada população e proporção, divididas pela produção média da monocultura naquela população.

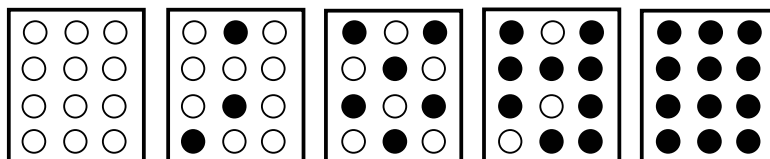


FIGURA 2. Esquema de distribuição nos vasos das plantas dos biótipos suscetível (○) e resistente (●) de *B. subalternans*. University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007. Da esquerda para a direita, as respectivas proporções de plantas do biótipo S e do R, em percentagens: 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 e 0:100.

Além da PR e PRT, a MSPA obtida dos biótipos e expressa em valores médios, foram submetidas à análise de variância. Quando o teste F foi significativo, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$), considerando-se as respectivas monoculturas como testemunhas. A PR da variável avaliada foi calculada da seguinte forma: $PR = \text{média da mistura} / \text{média da monocultura}$, incluindo-se no cálculo a média por planta de cada espécie em cada unidade experimental. A PRT foi representada pela soma das produtividades relativas do biótipo em questão e do biótipo competidor, nas respectivas proporções de plantas. Caso a PR resultasse em uma linha reta, considerou-se não haver efeito de um biótipo sobre o outro ou que a habilidade de um biótipo interferir sobre o outro fosse equivalente. Quando a PR resultasse em linha côncava, definiu-se ocorrer prejuízo no crescimento de um ou de ambos os biótipos. Quando a linha apresentada pela

PR foi convexa, houve benefício no crescimento de um ou de ambos os biótipos.

Quando a PRT foi igual a 1 (linha reta), significou que ocorreu competição semelhante entre os biótipos e pelo(s) mesmo(s) recurso(s) do meio. Caso a PRT fosse superior a 1 (linha convexa), não ocorreria competição, pelo fato de o suprimento de recursos superar a demanda ou porque os biótipos possuíam diferentes demandas pelo(s) recurso(s) do meio; caso a PRT fosse inferior a 1 (linha côncava), interpretar-se-iam os dados como interferência negativa pelos mesmos recursos do meio, havendo prejuízo mútuo ao crescimento de ambos os biótipos.

Os índices de competitividade relativa (CR), coeficientes de agrupamento relativo (K) e de competitividade (A) foram calculados na proporção de 50% das plantas dos biótipos e dos respectivos competidores. A CR representa o crescimento comparativo do biótipo S em relação a C (competidora); K indica a dominância relativa de um biótipo sobre o outro; e A aponta qual biótipo se manifesta mais competitivo (Cousens, 1991). A interpretação conjunta desses valores indica com maior segurança a competitividade dos biótipos envolvidos. O biótipo T é mais competitivo que C quando $CR > 1$, $K_t > K_c$ e $A > 0$. O biótipo C é mais competitivo que T quando $CR < 1$, $K_t < K_c$ e $A < 0$ (Hoffman & Buhler, 2002). Os cálculos foram realizados por meio das Equações 9 a 12, propostas por Cousens & O'Neill (1993):

$$CR = PR_t/PR_c \quad \text{Equação 9}$$

$$K_t = PR_t/(1 - PR_t) \quad \text{Equação 10}$$

$$K_c = PR_c/(1 - PR_c) \quad \text{Equação 11}$$

$$A = PR_t - PR_c \quad \text{Equação 12}$$

Para analisar estatisticamente a produtividade relativa, primeiramente foram calculadas as diferenças para os valores de PR obtidos nas proporções de 25, 50 e 75% de plantas em relação aos valores pertencentes às retas hipotéticas obtidas nas respectivas proporções (Passini, 2001). O teste 't', em nível de 5% de probabilidade, foi utilizado para testar as diferenças nos índices estudados em relação à reta hipotética (Passini, 2001; Hoffman & Buhler, 2002). As hipóteses de nulidade utilizadas para testar as diferenças de PR e A eram de que fossem iguais a zero ($H_0=0$); para PRT e CR, as médias seriam iguais a 1 ($H_0=1$); e para o índice K, de que as médias das diferenças entre K_t e K_c fossem iguais a zero [$H_0= (K_t-K_c) = 0$].

3.6 Genética da resistência

3.6.1 Contagem de cromossomos

Visando confirmar o número de cromossomos em ambos os biótipos (S e R) da espécie *B. subalternans*, diferenciando-os de outras espécies pertencentes ao complexo *Bidens*, análises citogenéticas foram conduzidas no Laboratório de Citogenética da Faculdade de Agronomia, UFRGS, nos anos de 2005 e 2006.

Inicialmente, foi conduzida uma análise da meiose, onde inflorescências (capítulos) foram colhidas de plantas de biótipos suscetíveis de *B. subalternans* crescidas em casa de vegetação no LaFlor, UFRGS. As inflorescências foram coletadas e fixadas ainda na casa de vegetação, em solução 3:1 (etanol:ácido acético) e deixadas por 24h à temperatura ambiente. Em seguida, foram transferidas para álcool 70% e armazenadas em congelador para preparação posterior das lâminas. As lâminas foram preparadas com as flores retiradas das

inflorescências. A partir de cada flor eram extraídas as anteras, sobre as quais era colocado o corante carmim propiônico 2%. Logo após, as anteras eram esmagadas na lâmina, cobertas com lamínula, pressionadas e batidas na extremidade com agulha histológica para tentar obter melhor espalhamento das células e dos cromossomos possível. Depois de prontas, as lâminas eram seladas com esmalte, identificadas e observadas ao microscópio.

Para a contagem dos cromossomos, realizou-se análise da mitose. Aquênios de ambos biótipos e de *Bidens pilosa*, foram colocados para germinar em papel germinador, umedecido com água destilada. Em seguida, o papel germinador foi enrolado, cada rolo foi identificado e colocado em CCCV, à temperatura de 28°C, sendo mantidos umedecidos até a germinação.

Quando as radículas de cada plântula atingiram em torno de 1 cm de comprimento, pontas de raízes foram coletadas e transferidas para vidros de 50 mL, contendo água destilada. Os vidros foram colocados em bandejas plásticas forradas com cubos de gelo e mantidas em geladeira, por período exato de 24h, para bloqueio da divisão celular. O monitoramento da temperatura foi realizado visando que não ocorresse congelamento do material. Após 24h, a água destilada de cada vidro foi substituída por fixador etanol:ácido acético (3:1), por um período de 18-24h, à temperatura ambiente.

Após a fixação do material, as radículas foram novamente lavadas em água destilada e realizou-se hidrólise à temperatura de 60°C, por 30 minutos, em vidros contendo HCL 1N. O material foi então lavado em água destilada e colocado em Feulgen por 30 min, em temperatura ambiente, e em seguida, por 1h em geladeira, para obter coloração. Posteriormente, as pontas de raiz foram

transferidas para as lâminas, esmagadas em carmim propiônico 2% e as lamínulas seladas com esmalte.

Todas as lâminas, tanto da meiose como da mitose, foram analisadas diretamente em microscópio óptico acoplado com câmera digital, com auxílio do programa de captação de imagem SDI, com aumento de 10x40 e 10x100. No mínimo 10 células, com bom espalhamento dos cromossomos, foram analisadas para cada indivíduo e, as melhores células fotografadas.

3.6.2 Estudo de herança genética

O presente trabalho foi realizado na casa de vegetação do LaFlor, UFRGS, durante os anos de 2005 e 2006. Previamente à contagem do número de cromossomos, plantas de *Bidens subalternans* de ambos os biótipos foram crescidas em casa de vegetação, em condições de crescimento previamente descritas no item 3.2.1 e identificadas taxonomicamente, na presença de taxonomista, de acordo com Mondin (2004).

A primeira etapa do estudo de herança consistiu da confirmação da suscetibilidade e da resistência dos biótipos aos inibidores de ALS. Quinze plantas no estágio de duas a quatro folhas de cada biótipo, foram aspergidas com 40 g ha⁻¹ do herbicida chlorimuron-ethyl (Tabela 1), equivalente ao dobro da dose recomendada, para confirmação da resistência e suscetibilidade aos inibidores da ALS. As plantas confirmadas resistentes foram mantidas em casa de vegetação isoladas para autofecundação, buscando obter progenitores homozigotos.

O bloco de cruzamentos conteve 40 plantas, 20 de cada genitor. Os genitores apresentavam diferentes épocas de semeadura, de forma a sempre

haver pólen disponível, e foram mantidos separados em casa de vegetação para evitar polinizações indesejadas. Uma planta de cada genitor foi mantida por vaso de 1L contendo solo e areia, na proporção 3:1. Após serem selecionados os progenitores, cruzamentos recíprocos entre plantas S e R foram realizados.

As flores de *B. subalternans* caracterizam-se por apresentarem capítulos com várias inflorescências, as quais abrem em tempos diferentes num mesmo capítulo. Quando capítulos de uma planta apresentavam 50% das inflorescências abertas, todas as demais presentes eram removidas com auxílio de uma pinça, deixando-se apenas uma ainda fechada. A inflorescência escolhida era então aberta com uma agulha histológica esterilizada em álcool 70%, expondo o estigma. A emasculação era realizada através de lavagem do estigma, várias vezes, com água destilada para que o pólen presente fosse removido e, em seguida, a flor era polinizada mais de uma vez com o pólen desejado. Após realizado o cruzamento, a inflorescência era protegida com um saco de papel manteiga, fechado e preso com um pedaço de fita adesiva ao redor do pecíolo da flor. O saco era mantido por pelo menos 2 dias quando, ao ser removido, percebia-se a posição do estigma curvado, confirmando o sucesso da fecundação. Este procedimento foi realizado em ambiente isolado dentro da casa de vegetação, evitando qualquer contaminação, a partir das 11 até 16h devido à disponibilidade de pólen.

Antes de a metodologia ser estabelecida para o cruzamento entre os biótipos de *B. subalternans*, testes foram realizados. Diversas inflorescências foram emasculadas, lavadas com água e protegidas com saco de papel, confirmando-se que a lavagem realmente evitava autofecundação.

A coleta dos aquênios produzidos nos cruzamentos, constituindo a geração F1, foi realizada no final do ciclo, quando da sua maturidade, os quais foram secos ao sol e após, acondicionados em sacos de papel e mantidos em geladeira. As sementes F1 foram pré-germinadas em placas de Petri com papel germinador umedecido com água destilada, em CCCV à 28°C de temperatura. Após a emergência, as plântulas foram transplantadas para vasos de 8L, preenchidos com solo na proporção solo e areia 3:1. As plantas foram mantidas na casa de vegetação do LaFlor, UFRGS, para produção de sementes F2.

Nos meses de julho a agosto de 2007, novos cruzamentos foram realizados na casa de vegetação da University of Arkansas, EUA. Parte das sementes F1 produzidas foi utilizada para a produção da geração F2. A outra parte das sementes foi trazida à casa de vegetação do LaFlor, UFRGS, em março de 2008, e colocadas para germinar em CCCV, nas mesmas condições citadas acima, visando produzir geração F2.

4 RESULTADOS

4.1 Curvas de dose-resposta e ensaios enzimáticos

4.1.1 Curvas de dose-resposta sobre crescimento de planta

As avaliações de controle realizadas aos 21 DAT para o Ensaio 1, confirmaram resistência aos inibidores da ALS para o biótipo R (Tabela 5). A análise dos dados através do teste F demonstrou interação significativa entre herbicida x dose (por biótipo) ($p \leq 0,05$). Deste modo, os dados de controle para os biótipos R e S foram ajustados ao modelo sigmoidal (Figura 3).

TABELA 5. Equação^a utilizada para determinar a dose necessária para obter 50% de controle (C_{50}) das plantas dos biótipos de *Bidens subalternans* suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da ALS – Ensaio 1. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2006.

Herbicidas	Biótipo	a	b	Xa_{50} (g i.a ha ⁻¹)	C_{50} (g i.a ha ⁻¹)	R^2 ^b	FR ^c	Itr ^d
chlorimuron-ethyl	S	99,0	0,61	1,9	1,9	0,99	---	12
	R	31,8	16,09	71,1	>160,0	0,95	>84	6
imazethapyr	S	86,3	5,69	11,6	13,0	0,92	---	16
	R	24,7	86,65	420,9	>848,0	0,96	>65	6
cloransulam-methyl	S	98,3	0,56	2,6	2,9	0,99	---	10
	R	26,1	26,52	95,7	>240,0	0,94	>86	8
bispyribac-sodium	S	95,6	0,75	3,8	3,9	0,99	---	16
	R	32,7	59,70	171,8	>400,0	0,91	>103	9

^a Equação sigmoidal $Y = a / (1 + \exp(-(X-Xa_{50})/b))$. ($p < 0,0001$).

^b Coeficiente de determinação.

^c Fator de resistência = C_{50R}/C_{50S} .

^d Itr = número de iterações utilizadas para ajustar os parâmetros da equação.

Neste ensaio preliminar conduzido até 21 DAT, visou-se identificar níveis de resistência para o biótipo R, quando comparado ao S. Fatores de resistência elevados foram observados, sendo o maior e o menor, respectivamente, em valores absolutos, para bispyribac-sodium e imazethapyr, ficando chlorimuron-

ethyl e cloransulam-methyl em situação intermediária (Tabela 5). O C_{50} estimado para bispyribac-sodium no biótipo R foi superior a 8x a dose recomendada de 50 g ha^{-1} .

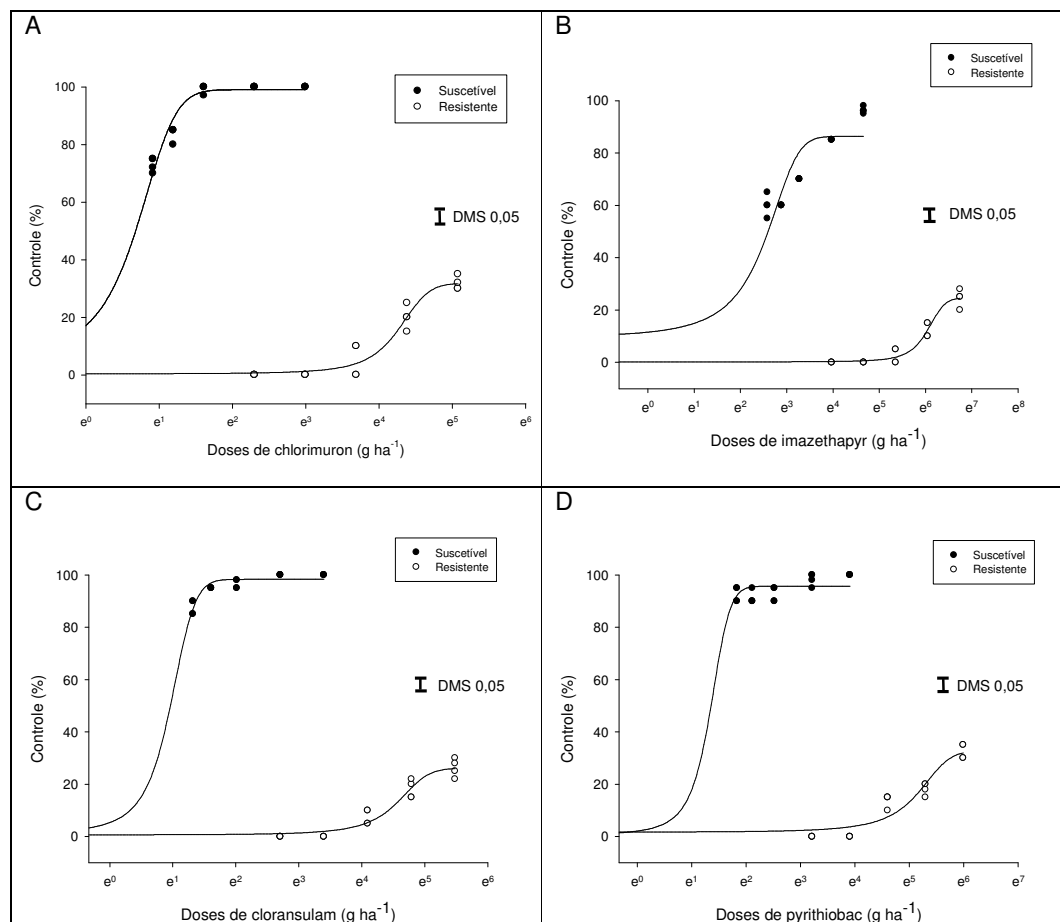


FIGURA 3. Controle dos biótipos de *Bidens subalternans* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS com os herbicidas chlorimuron-ethyl (A), imazethapyr (B), cloransulam-methyl (C) e bispyribac-sodium (D), 21 dias após a aplicação dos tratamentos - Ensaio 1. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2006.

Neste ensaio, não foi possível obter controle de 50% para o biótipo R até a dose testada, a qual foi equivalente à 8x àquela recomendada para cada herbicida (Figura 3). Deste modo, doses mais elevadas foram estabelecidas para o biótipo R no Ensaio 2. Cabe ainda salientar que as plantas de ambos os biótipos no Ensaio 1, encontravam-se em estágio superior (4 a 6 folhas)

quando da aplicação dos tratamentos, quando comparadas às aquelas do Ensaio 2 (2 a 4 folhas).

No Ensaio 1, o herbicida bispyribac-sodium foi utilizado como representante do grupo químico dos pirimidil-benzoatos. Entretanto, bispyribac-sodium é recomendado para o controle de ervas na cultura do arroz irrigado, o qual não é cultivado na área de coleta do biótipo. Assim, para o Ensaio 2 optou-se por avaliar pyriithiobac-sodium, pertencente ao mesmo grupo químico e registrado para o controle de picão-preto na cultura do algodão, pois pertence à rotação utilizada pelo agricultor onde foi selecionado o biótipo.

Para o Ensaio 2, a análise através do teste F demonstrou interação significativa entre herbicida x dose (por biótipo) ($p \leq 0,05$) para as variáveis controle e MSPA, determinados aos 28 DAT. Os dados foram ajustados ao modelo log-logístico (Tabela 6).

TABELA 6. Equação^a utilizada para determinar a dose necessária para obter 50% de controle (C_{50}) das plantas dos biótipos de *Bidens subalternans* suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da ALS – Ensaio 2. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008.

Herbicidas	Biótipo	a	b	Xa_{50} (g i.a ha ⁻¹)	C_{50} (g i.a ha ⁻¹)	R^{2b}	FR ^c	Itr ^d
chlorimuron-ethyl	S	99,6	-3,21	0,8	0,8	0,99	---	15
	R	85,0	-3,73	363,9	400,2	0,99	498	41
imazethapyr	S	107,5	-0,69	5,5	4,5	0,99	---	31
	R	99,7	-1,12	3593,1	3626,6	0,98	797	19
cloransulam-methyl	S	106,2	-0,98	1,6	1,4	0,99	---	27
	R	76,8	-3,44	822,8	1002,6	0,97	726	25
pyriithiobac-sodium	S	108,3	-1,13	11,8	10,2	0,98	---	28
	R	41,0	-3,13	4209,9	>8960,0	0,99	>877	13

^a Equação sigmoideal $Y = a / (1 + (X/Xa_{50})^b)$. ($p < 0,0001$).

^b Coeficiente de determinação.

^c Fator de resistência = C_{50R}/C_{50S} .

^d Itr = número de iterações utilizadas para ajustar os parâmetros da equação.

Para os resultados de controle, as curvas de resposta às doses sobre crescimento de planta indicam que, para ambos os biótipos, o nível de controle aumentou com o incremento da dose herbicida (Figura 4). Mas, no biótipo R, o

nível de controle se elevou em menor magnitude e de forma mais gradual do que no biótipo S.

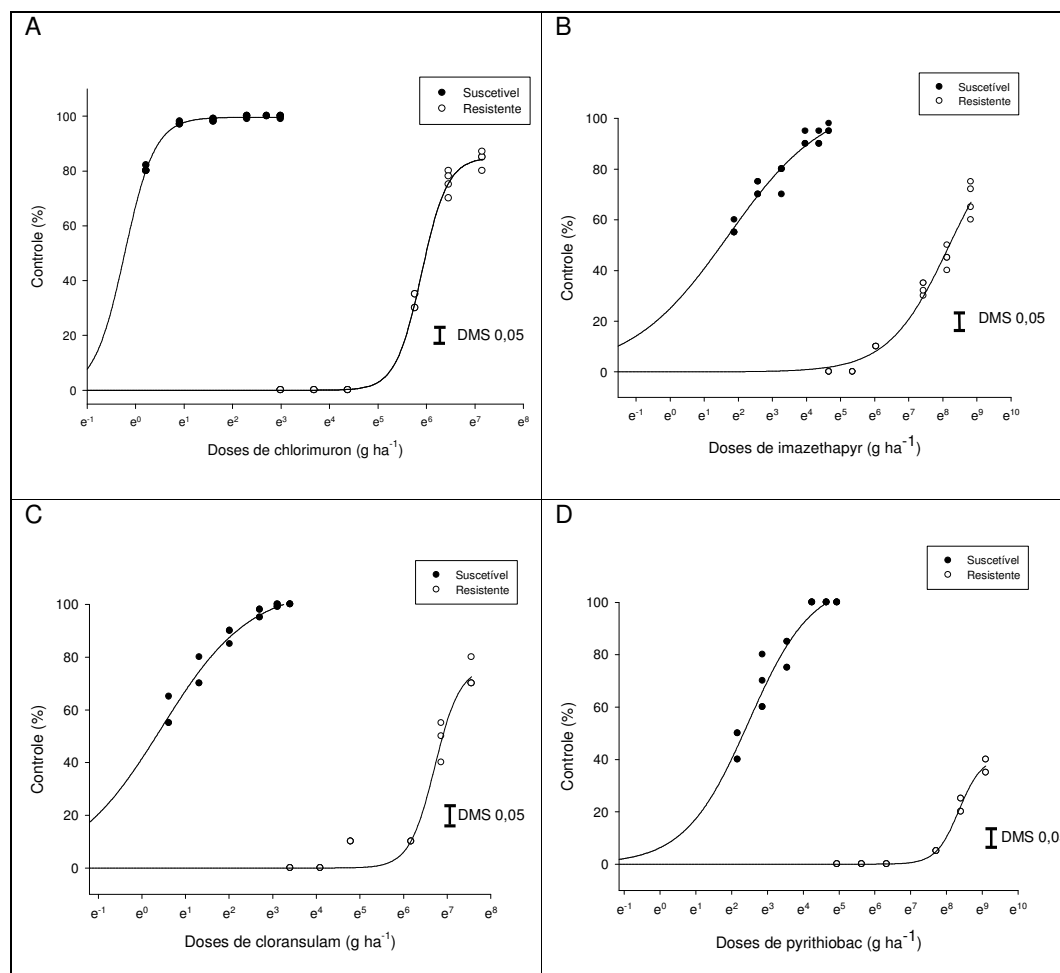


FIGURA 4. Controle dos biótipos de *Bidens subalternans* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS com os herbicidas chlorimuron-ethyl (A), imazethapyr (B), cloransulam-methyl (C) e pyriithiobac-sodium (D), 28 dias após a aplicação dos tratamentos - Ensaio 2. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008.

Elevado nível de resistência foi observado para o herbicida pyriithiobac-sodium, sendo necessária dose superior a 8960 g ha⁻¹ para controlar 50% do biótipo R, o que equivale a 64x a dose recomendada de 140 g ha⁻¹ (Tabela 6). Fatores de resistência da ordem de 726 e 797 foram observados para os herbicidas cloransulam-methyl e imazethapyr, respectivamente. Neste caso, o C₅₀ para o R equivaleu a 33 e 36x a dose recomendada para os mesmos

herbicidas de 30 e 100 g ha⁻¹, respectivamente. Para chlorimuron-ethyl foi observado fator de resistência da ordem de 498, onde o C₅₀ para o biótipo R equivaleu a 20x a dose de rótulo do produto.

Para a MSPA, as curvas de dose-resposta indicam reduções para ambos os biótipos em função do incremento da dose herbicida, com fatores de resistência elevados para o biótipo R (Tabela 7). Todavia, para o biótipo S, a redução da massa seca ocorreu em maior magnitude quando comparado ao R.

TABELA 7. Equação^a utilizada para determinar a dose necessária para obter 50% de redução da massa seca (GR₅₀) das plantas dos biótipos de *Bidens subalternans* suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da ALS – Ensaio 2. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008.

Herbicidas	Biótipo	a	b	Xa ₅₀ (g i.a ha ⁻¹)	GR ₅₀ (g i.a ha ⁻¹)	R ² ^b	FR ^c	Itr ^d
chlorimuron-ethyl	S	99,9	0,64	0,09	0,08	0,99	---	14
	R	99,9	0,44	30,1	28,9	0,98	361	12
imazethapyr	S	100,0	0,91	1,54	1,53	0,99	---	16
	R	100,1	0,78	966,54	974,2	0,94	637	12
cloransulam-methyl	S	100,3	1,18	1,49	1,52	0,98	---	14
	R	99,8	0,53	573,64	585,9	0,89	386	13
pyrithiobac-sodium	S	99,9	0,68	0,73	0,71	0,99	---	14
	R	100,3	0,37	4246,69	4503,8	0,95	6343	13

^a Equação sigmoidal $Y = a / (1 + (X/Xa_{50})^b)$. (p<0,0001).

^b Coeficiente de determinação.

^c Fator de resistência = GR₅₀R/GR₅₀S.

^d Itr = número de iterações utilizadas para ajustar os parâmetros da equação.

De acordo com os resultados de MSPA, o biótipo S foi controlado em 98% com a dose da bula de chlorimuron-ethyl (20 g ha⁻¹). Para o biótipo R só se obteve controle de 84% na máxima dose avaliada, 1280 g ha⁻¹ (Figura 5A). A dose recomendada de imazethapyr de 100 g ha⁻¹ reduziu a MSPA do biótipo S em 97%. Entretanto, para o R, foram necessários 6784 g ha⁻¹ para reduzir esta variável em 88% (Figura 5B). O biótipo S foi controlado acima de 90% com dose de cloransulam-methyl inferior a 30 g ha⁻¹, enquanto que o maior controle para o R foi de 73% com dose de 1920 g ha⁻¹, 64x a dose recomendada (Figura 5C). A dose de 140 g ha⁻¹ de pyrithiobac-sodium reduziu em 100% a MSPA do S. Todavia, o R foi apenas controlado em 57% com a maior dose

testada, equivalente a 8960 g ha⁻¹ (Figura 5D). Os resultados observados nos Ensaio 1 e 2 demonstram que o biótipo R de *B. subalternans* apresenta elevados níveis de resistência e também, resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ALS.

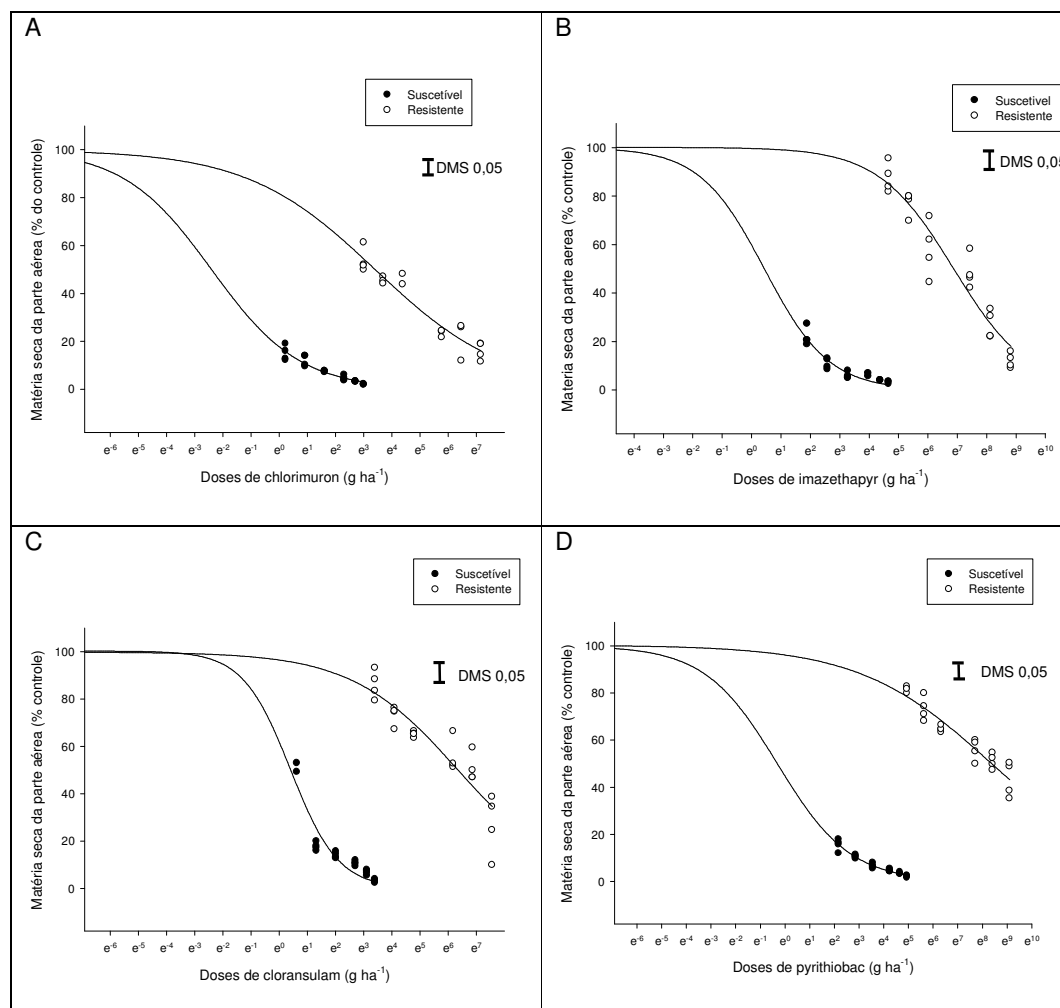


FIGURA 5. Redução da massa seca da parte aérea dos biótipos de *Bidens subalternans* suscetível e resistente aos inibidores da ALS em função da aplicação dos herbicidas chlorimuron-ethyl (A), imazethapyr (B), cloransulam-methyl (C) e pyriithiobac-sodium (D) - Ensaio 2. UFRGS, Porto Alegre - RS, 2008.

4.1.2 Ensaio enzimáticos

A análise dos dados, através do teste F, demonstrou interação significativa entre herbicida x dose (biótipo) ($p \leq 0,001$) para a atividade da

enzima ALS. Os dados foram ajustados ao modelo log-logístico. Elevados níveis de resistência, apresentados pelo biótipo R de *B. subalternans*, também foram refletidos em nível enzimático (Tabela 8).

TABELA 8. Equação^a utilizada para determinar a dose necessária para reduzir 50% da atividade de ALS (I_{50}) nos ensaios enzimáticos *in vivo* dos biótipos de *Bidens subalternans* suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da mesma. University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.

Herbicidas	Biótipo	a	b	Xa_{50} (g i.a ha ⁻¹)	I_{50} (g i.a ha ⁻¹)	R^{2b}	FR ^c	Itr ^d
chlorimuron-ethyl	S	89,0	1,06	11,8	9,6	0,99	---	51
	R	100,4	0,19	155,1	162,8	0,99	17	13
imazethapyr	S	102,6	0,53	21,4	23,6	0,99	---	13
	R	100,6	0,92	3913,5	3907,7	0,99	166	11
cloransulam-methyl	S	100,5	0,37	0,73	0,7	0,98	---	12
	R	99,8	0,17	327,4	321,7	0,99	434	12
pyrithiobac-sodium	S	99,2	0,54	14,1	13,5	0,99	---	13
	R	99,1	0,63	8872,3	7000,0	0,99	516	18

^a Equação sigmoidal $Y = a / (1 + (X/Xa_{50})^b)$. ($p < 0,0001$).

^b Coeficiente de determinação.

^c Fator de resistência = I_{50R}/I_{50S} .

^d Itr = número de iterações utilizadas para ajustar os parâmetros da equação.

Os valores do I_{50} para imazethapyr e cloransulam-methyl equivaleram a 3908 e 322 g ha⁻¹, respectivamente, correspondendo a 166 e 434 vezes maior fator de resistência para o biótipo R quando comparados ao S (Figuras 6B e 6C). O padrão de resistência cruzada apresentado nos ensaios enzimáticos, assemelha-se àquele apresentado pelas curvas de dose-resposta. De acordo com a atividade da ALS na presença dos herbicidas, o biótipo R apresentou, em valores absolutos, maior nível de resistência para pyrithiobac-sodium (Figura 6D) e menor para chlorimuron-ethyl (Figura 6A). O I_{50} do biótipo R para pyrithiobac-sodium equivaleu a 7000 g ha⁻¹, ou seja, 50x a dose recomendada de 140 g ha⁻¹, quando comparado ao S. Para chlorimuron-ethyl, o I_{50} do biótipo R excedeu apenas em 8x a dose recomendada do herbicida. Imazethapyr e cloransulam-methyl, assim como no Ensaio 2 de curva de dose sobre

crescimento de planta, com base em valores absolutos, ficaram em situação intermediária.

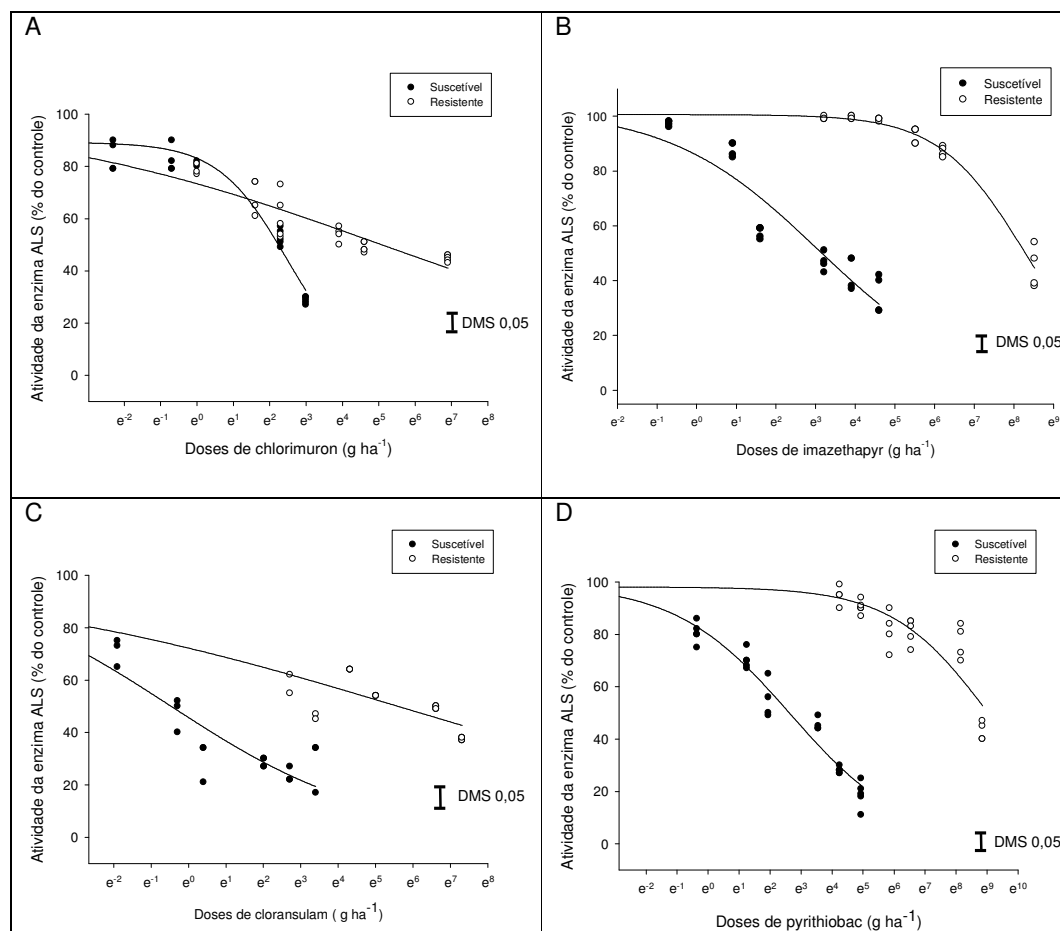


FIGURA 6. Efeito dos herbicidas chlorimuron-ethyl (A), imazethapyr (B), cloransulam-methyl (C) e pyrithiobac-sodium (D) na atividade da enzima ALS dos biótipos de *Bidens subalternans* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS. University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.

4.2 Sequenciamento do gene da ALS

4.2.1 Amplificação parcial do gene da ALS

Dois pares de *primers* foram desenvolvidos a partir de seqüências depositadas no GenBank para *Bidens pilosa*, visando a amplificação dos domínios C, A, D e B, E, respectivamente, do gene da ALS em *B. subalternans*. Entretanto, o par de *primers* correspondente aos domínios C, A, D não

produziu *amplicons*. Deste modo, um par de *primers* degenerados utilizados por Prado *et al.* (2004), foi testado para amplificação da mesma região (Figura 7).

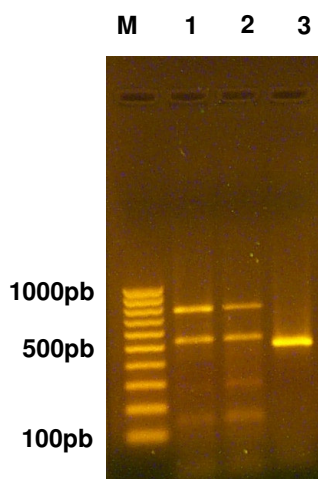


FIGURA 7. Produtos da amplificação dos domínios C, A, D (1 = suscetível; 2 = resistente) e B, E (3 = suscetível) do gene da ALS em *Bidens subalternans*, separados em gel de agarose 0,8%, corados com brometo de etídio. Marcador 100pb (M). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.

Dois fragmentos foram amplificados; o maior, com 780pb, apresentou similaridade de 99% com os domínios C, A, D do gene da ALS em *B. pilosa* (acesso AJ632115, GenBank). O segundo fragmento amplificado, com 550pb, não foi associado a ALS. Já, os *primers* correspondentes aos domínios B, E amplificaram um fragmento de 490pb em *B. subalternans* (Figura 7). Este fragmento apresentou 98% de similaridade com o acesso AJ514936 (GenBank), referente aos domínios B, E em *B. pilosa*.

Um novo par de *primers* específicos (1_F e 1_R) foi desenvolvido para amplificar os domínios C, A, D, após o sucesso da amplificação com os *primers* degenerados (Tabela 4). Os novos *primers* amplificaram um fragmento de aproximadamente 677pb (Figura 8). Todavia, ao ser submetido ao seqüenciamento, foi constatada a ocorrência de mais de um produto,

possivelmente outro alelo do gene da ALS ocorrente na poliplóide *B. subalternans*. O mesmo ocorreu quando da amplificação da Região 2, ou intermediária entre os domínios (Figura 9), a qual produziu apenas um fragmento de 545pb, mas com mais de um produto. Algumas tentativas, como o desenvolvimento de *primers* mais específicos, foram testadas. Entretanto, não se obteve sucesso na separação dos alelos e optou-se pela clonagem.

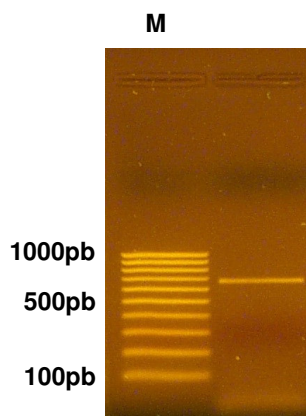


FIGURA 8. Produto da amplificação dos domínios C, A, D do gene da ALS em biótipo suscetível de *Bidens subalternans*, separado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio. Marcador 100pb (M). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.

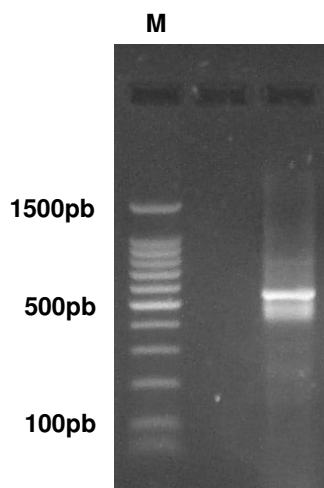


FIGURA 9. Produto da amplificação da região intermediária entre os domínios conservados do gene da ALS em biótipo suscetível de *Bidens subalternans*, separado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio. Marcador 100pb (M). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.

4.2.2 Clonagem das regiões 1 e 2 do gene da ALS

A clonagem das Regiões 1 e 2 foi realizada com os pares de *primers* 1_F e 1_R e, 2_F e 2_R, respectivamente (Tabela 4). Três plantas de cada biótipo, R e S, foram utilizadas como repetições e, pelo menos, seis clones de cada planta foram sequenciados (Figura 10). O vetor sem inserto foi utilizado como controle negativo.

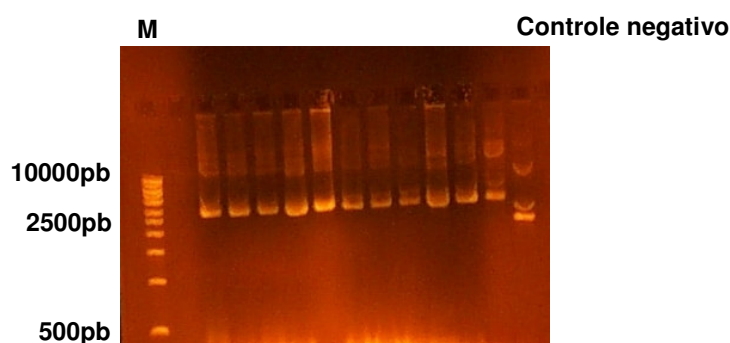


FIGURA 10. Verificação da presença do inserto no plasmídio, na clonagem dos domínios C, A, D do gene da ALS de *Bidens subalternans*. Produtos separados em gel de agarose 0,8%, corados com brometo de etídio. Marcador 1Kb (M). University of Arkansas, Fayetteville – AR, 2007.

Obtidas as seqüências isoladas dos alelos da Região 2, um novo par de *primers* foi desenvolvido para amplificação direta do segundo alelo para a Região 3 (domínios B, E). O par 4_F e 4_R (Tabela 4) amplificou um fragmento de 510pb, correspondente aos domínios B,E (Figura 11). Este fragmento foi 94% similar com o acesso AJ514936 (GenBank), referente aos domínios B, E em *B. pilosa*.

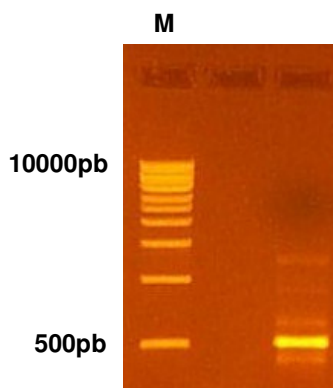


FIGURA 11. Produto da amplificação dos domínios B, E do gene da enzima ALS em biótipo suscetível de *Bidens subalternans*, separado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio. Marcador 1Kb (M). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.

4.2.3 Análise das seqüências do gene da ALS

O sequenciamento parcial do gene da ALS em *B. subalternans* foi conduzido em duas etapas. Inicialmente, os domínios C, A, D (Região 1), B, E (Região 3) e a região intermediária (Região 2) foram seqüenciados separadamente nos biótipos S e R, visando identificar mutações para a resistência. Posteriormente, a seqüência completa do gene da ALS foi amplificada. Três alelos, denominados ALS1, ALS2 e ALS3 foram obtidos após a clonagem dos domínios C, A, D do gene da ALS em ambos os biótipos (Figura 12). Estes alelos consistiram de 677 nucleotídeos cada (Figura 12), traduzidos em 225 aminoácidos (Figura 13).

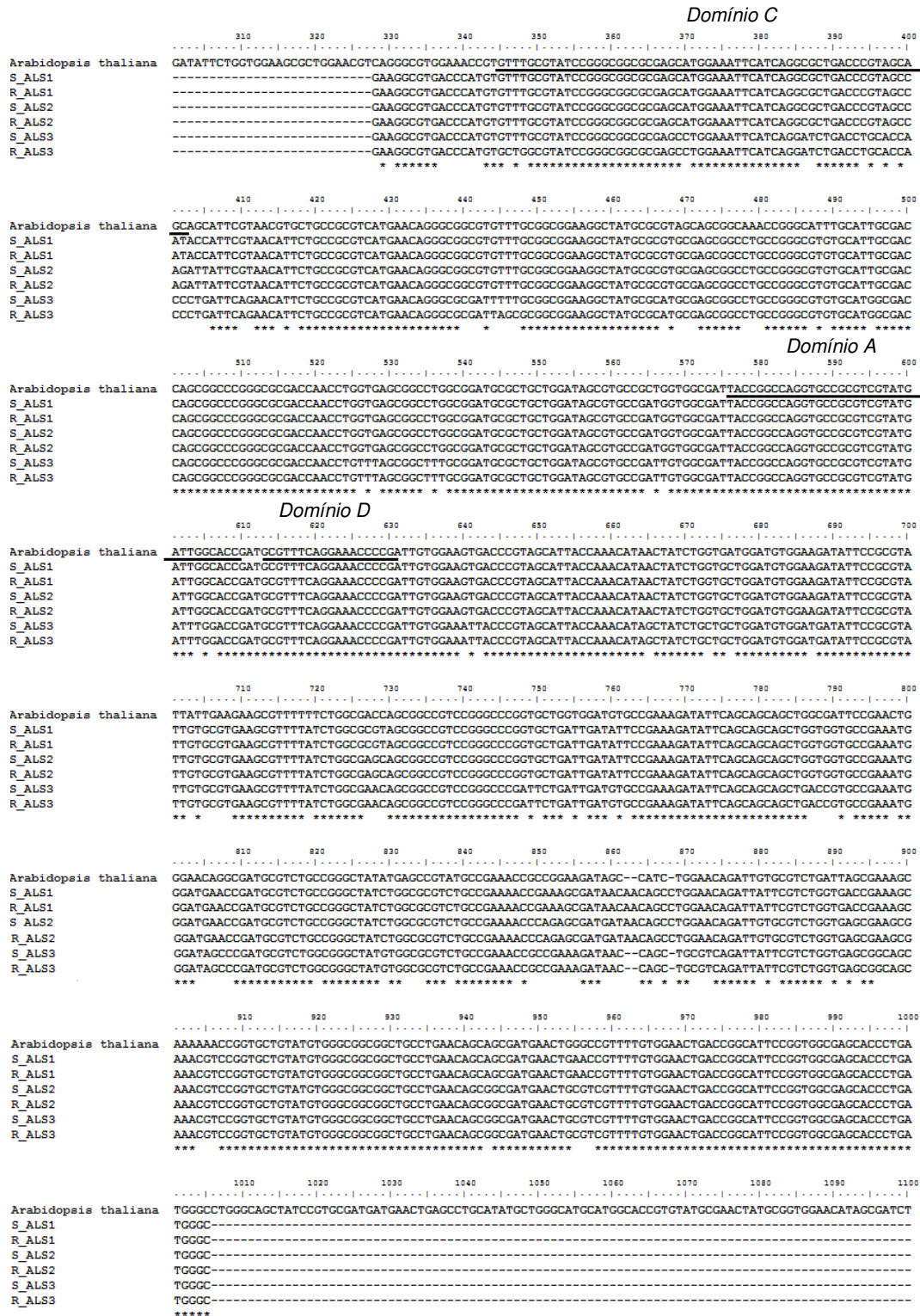


FIGURA 12. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos dos domínios C, A, D do gene da enzima ALS dos biótipos suscetível (S_) e resistente (R_) de *Bidens subalternans*, com a seqüência do mesmo gene de *Arabidopsis thaliana* (acesso X51514, GenBank). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007. Similaridades entre as seqüências estão representadas pelos asteriscos.

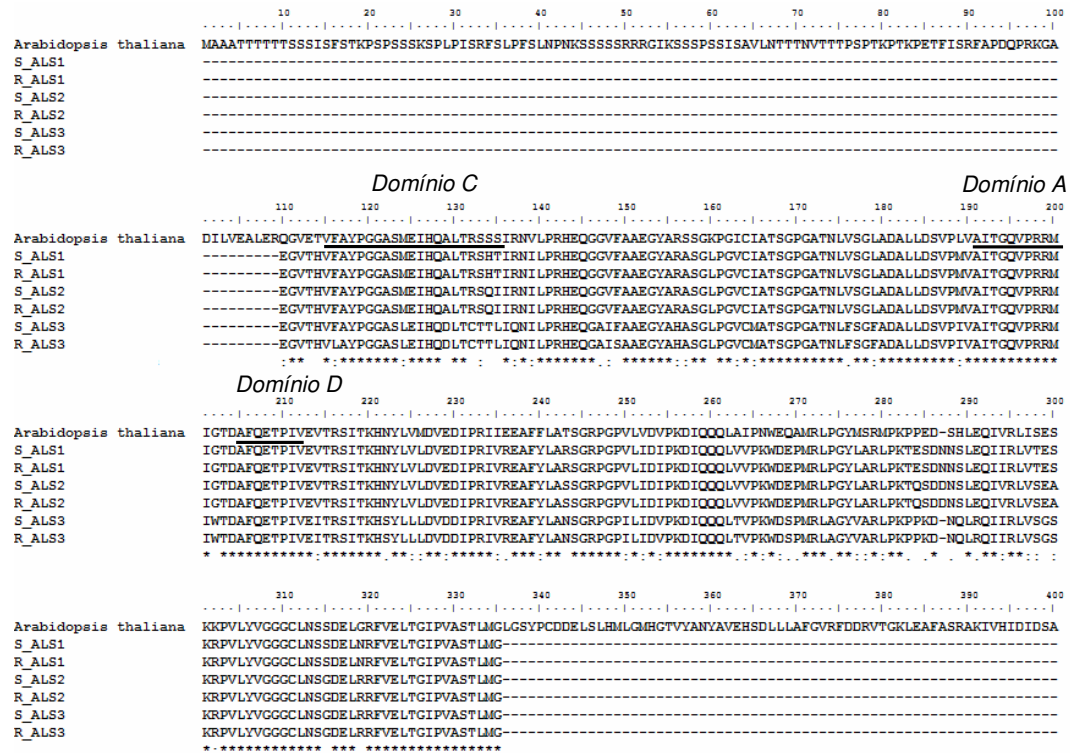


FIGURA 13. Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos domínios C, A, D da enzima ALS dos biótipos suscetível (S_) e resistente (R_) de *Bidens subalternans* com a seqüência do mesmo gene de *Arabidopsis thaliana* (seqüência protéica correspondente ao acesso X51514, GenBank). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007. Similaridades entre as seqüências estão representadas pelos asteriscos.

Não foram identificados polimorfismos entre as seqüências S_ALS1 e R_ALS1, bem como entre S_ALS2 e R_ALS2. Já, para ALS3, cinco polimorfismos na seqüência nucleotídica do biótipo R resultaram em duas alterações na seqüência de aminoácidos: a substituição de TTT por CTG (códon 346-348) (Figura 12) resultou na alteração do aminoácido Phe por Leu, na posição 116 (de acordo com a seqüência de *Arabidopsis thaliana*), domínio C (Figura 13); também, a alteração de TTT por AGC (códon 445-447) substituiu Phe por Ser na posição 149, domínio A. As seqüências ALS1 e ALS2

apresentam similaridade de 95% entre si, enquanto que ALS3 é 90% similar às mesmas.

Três alelos para o gene da ALS também foram identificados na região intermediária entre os domínios, denominada Região 2. Os fragmentos consistiram de 545 nucleotídeos (Figura 14), traduzidos em 181 aminoácidos (Figura 15), havendo uma sobreposição de oito aminoácidos com a Região 1. Não foram identificados polimorfismos entre as seqüências dos biótipos S e R. ALS1 foi 98% similar à ALS2. As duas seqüências diferem por três deleções na posição 429 a 431 dos aminoácidos (Figura 15). Já, ALS3 foi similar em 89% à ALS1 e ALS2.

O sequenciamento dos domínios B, E identificou apenas dois alelos, denominados ALS1 e ALS2, para ambos os biótipos. Para esta região, o sequenciamento foi realizado de forma direta, ou seja, sem clonagem, com pares de *primers* distintos. Desta maneira, ALS1 correspondeu a 488 nucleotídeos (Figura 16) traduzidos em 162 aminoácidos (Figura 17), não sendo encontrados polimorfismos entre os biótipos S e R para este fragmento. Já, ALS2 consistiu de 513 nucleotídeos, os quais foram traduzidos em 170 aminoácidos. Para o alelo 2, apenas um polimorfismo foi identificado entre os biótipos R e S, resultando na alteração da seqüência de aminoácidos, em uma posição previamente relatada por conferir resistência aos inibidores da ALS (Tabela 9).

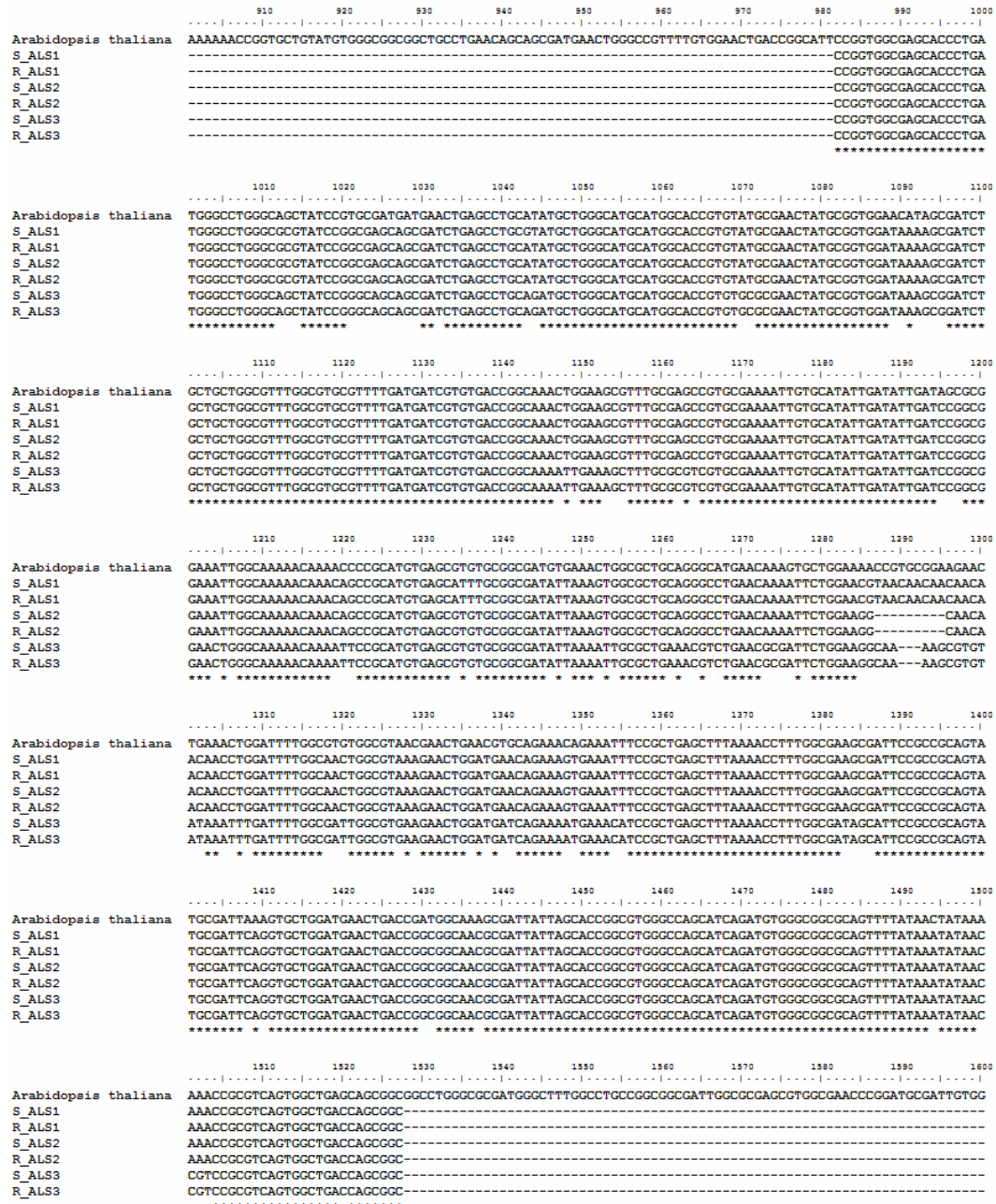


FIGURA 14. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da região intermediária entre os domínios conservados do gene da enzima ALS dos biótipos suscetível (S₋) e resistente (R₋) de *Bidens subalternans*, com a seqüência do mesmo gene de *Arabidopsis thaliana* (acesso X51514, GenBank). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007. Similaridades entre as seqüências estão representadas pelos asteriscos.

```

          310       320       330       340       350       360       370       380       390       400
Arabidopsis thaliana  KGPVLYVGGGCLNSSDELGRFVELTCIPVASTLMGLGSPYPCDELSLHMLGMHGTVYANYAVEHSDLLAFGVRFDDRVTKLEAFASRAKIVHIDIDSA
S_ALS1                -----PVASTLMGLGAYPASSDLSLHMLGMHGTVYANYAVDKSDLLAFGVRFDDRVTKLEAFASRAKIVHIDIDPA
R_ALS1                -----PVASTLMGLGAYPASSDLSLHMLGMHGTVYANYAVDKSDLLAFGVRFDDRVTKLEAFASRAKIVHIDIDPA
S_ALS2                -----PVASTLMGLGAYPASSDLSLHMLGMHGTVYANYAVDKSDLLAFGVRFDDRVTKLEAFASRAKIVHIDIDPA
R_ALS2                -----PVASTLMGLGAYPASSDLSLHMLGMHGTVYANYAVDKSDLLAFGVRFDDRVTKLEAFASRAKIVHIDIDPA
S_ALS3                -----PVASTLMGLGSPYPCSSDLSLQMLGMHGTVCANYAVDKADLLAFGVRFDDRVTKIESFARRAKIVHIDIDPA
R_ALS3                -----PVASTLMGLGSPYPCSSDLSLQMLGMHGTVCANYAVDKADLLAFGVRFDDRVTKIESFARRAKIVHIDIDPA
*****:** .....***** *****:.....*****:** *******

          410       420       430       440       450       460       470       480       490       500
Arabidopsis thaliana  EIGKNTPHVSVCGDVKLAIQGMNKVLENRAEELKLDFGVWRNELNVQKQKPLSFKTFGEAIPQYAIQVLELTDGKAIISTGVGQHMAAQFYKYK
S_ALS1                EIGKNTPHVSVCGDIKVALQGLNKKI LERNNNNNLDFGNWRKELDEQKVKFPLSFKTFGEAIPQYAIQVLELTDGKAIISTGVGQHMAAQFYKYK
R_ALS1                EIGKNTPHVSVCGDIKVALQGLNKKI LERNNNNNLDFGNWRKELDEQKVKFPLSFKTFGEAIPQYAIQVLELTDGKAIISTGVGQHMAAQFYKYK
S_ALS2                EIGKNTPHVSVCGDIKVALQGLNKKI LE---GNNNLDFGNWRKELDEQKVKFPLSFKTFGEAIPQYAIQVLELTDGKAIISTGVGQHMAAQFYKYK
R_ALS2                EIGKNTPHVSVCGDIKVALQGLNKKI LE---GNNNLDFGNWRKELDEQKVKFPLSFKTFGEAIPQYAIQVLELTDGKAIISTGVGQHMAAQFYKYK
S_ALS3                ELGKNTPHVSVCGDIKIALKRLNNAILE--GKSVYKFDGWRRELDQKMKHPLSFKTFGDSIPQYAIQVLELTDGKAIISTGVGQHMAAQFYKYK
R_ALS3                ELGKNTPHVSVCGDIKIALKRLNNAILE--GKSVYKFDGWRRELDQKMKHPLSFKTFGDSIPQYAIQVLELTDGKAIISTGVGQHMAAQFYKYK
*****:**.....** :* ** * *****:.....*****:** *******

          510       520       530       540       550       560       570       580       590       600
Arabidopsis thaliana  KPRQNLSSGGLGAMGFLPAAGASVANPDATVVDIDGDSFIMNVQELATIRVENLPVKVLLNNQHLCGMVQWEDREYKANRAHTFLGDPAGEDEIFP
S_ALS1                KPRQNLTSG-----
R_ALS1                KPRQNLTSG-----
S_ALS2                KPRQNLTSG-----
R_ALS2                KPRQNLTSG-----
S_ALS3                RPRQNLTSG-----
R_ALS3                RPRQNLTSG-----
*****:**

```

FIGURA 15. Alinhamento das seqüências de aminoácidos da região intermediária entre os domínios conservados da ALS dos biótipos suscetível (S_) e resistente (R_) de *Bidens subalternans*, com a seqüência de *Arabidopsis thaliana* (seqüência protéica correspondente ao acesso X51514, GenBank). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007. Similaridades entre as seqüências estão representadas pelos asteriscos.

TABELA 9. Polimorfismos de nucleotídeos e aminoácidos das seqüências do gene da ALS, referentes ao domínio B, de biótipos resistente e suscetível de *Bidens subalternans*.

Biótipo	Seqüência	Códon (1723-1725) ¹	Aminoácido (574) ^a
Suscetível	S_ALS2	TGG	Trp
Resistente	R_ALS2	TTG	Leu

^a Numeração baseada na seqüência de nucleotídeos e aminoácidos de *Arabidopsis thaliana* (acesso X51514, GenBank).

A alteração nos nucleotídeos foi traduzida na mutação de Trp para Leu, posição 574. As seqüências referentes ao alelo 2 para ambos os biótipos foram depositadas no GenBank (acessos EU622537 e EU622538, respectivamente para os biótipos R e S). Ambas as seqüências pertencentes à Região 3 (ALS1 e ALS2), tiveram sobreposição de 15 aminoácidos com a Região 2. ALS1 e ALS2 apresentaram similaridade de 94%.

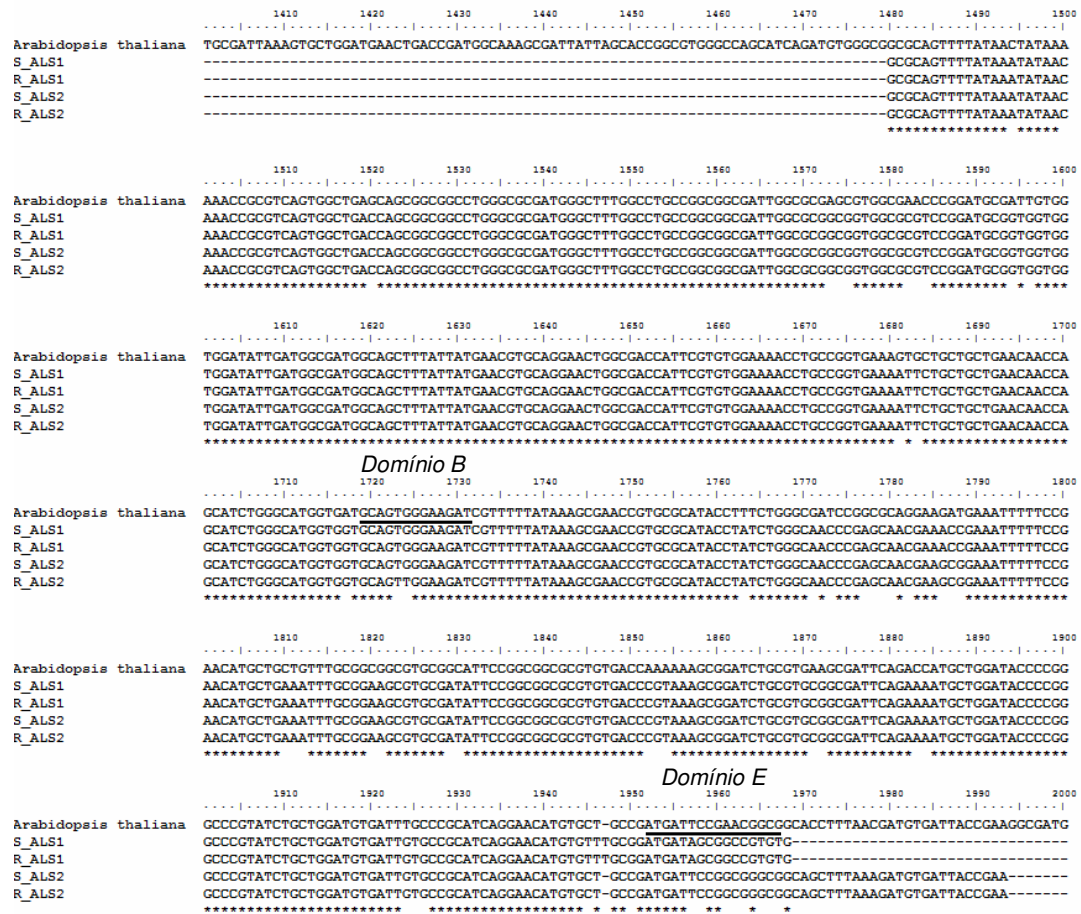


FIGURA 16. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos dos domínios B, E do gene da ALS dos biótipos suscetível (S_) e resistente (R_) de *Bidens subalternans*, com a seqüência de *Arabidopsis thaliana* (acesso X51514, GenBank). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007. Similaridades entre as seqüências estão representadas pelos asteriscos.

Obtidos os fragmentos do gene da ALS separadamente, partiu-se para a segunda etapa do sequenciamento, na qual consistiu da obtenção da seqüência inteira do gene da ALS. Pelo menos três alelos para o gene da ALS em *B. subalternans* foram identificados após o sequenciamento parcial do gene.



FIGURA 17. Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos domínios B, E da ALS dos biótipos suscetível (S_) e resistente (R_) de *Bidens subalternans*, com a seqüência de *Arabidopsis thaliana* (seqüência protéica correspondente ao acesso X51514, GenBank). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007. Similaridades entre as seqüências estão representadas pelos asteriscos.

Dada a conservação das seqüências e das regiões sobrepostas, não foi possível, inicialmente, determinar qual seqüência da Região 1 (domínios C, A, D) seria correspondente à seqüência da Região 3 (domínios B, E). Deste modo, combinações dos *primers forward* da Região 1 com *primers reverse* da Região 3 foram testadas. Foi possível definir uma seqüência completa, ou seja, um dos alelos, denominado ALS1 (Figura 18). A seqüência parcial do alelo ALS1 possui 1641 nucleotídeos, traduzidos em 547 aminoácidos. Ela apresentou 84% de similaridade com a seqüência da ALS 1 de *Helianthus annuus* (acesso AY541454, GenBank). Como descrito no sequenciamento em partes, não foram encontrados polimorfismos entre os biótipos para este alelo.

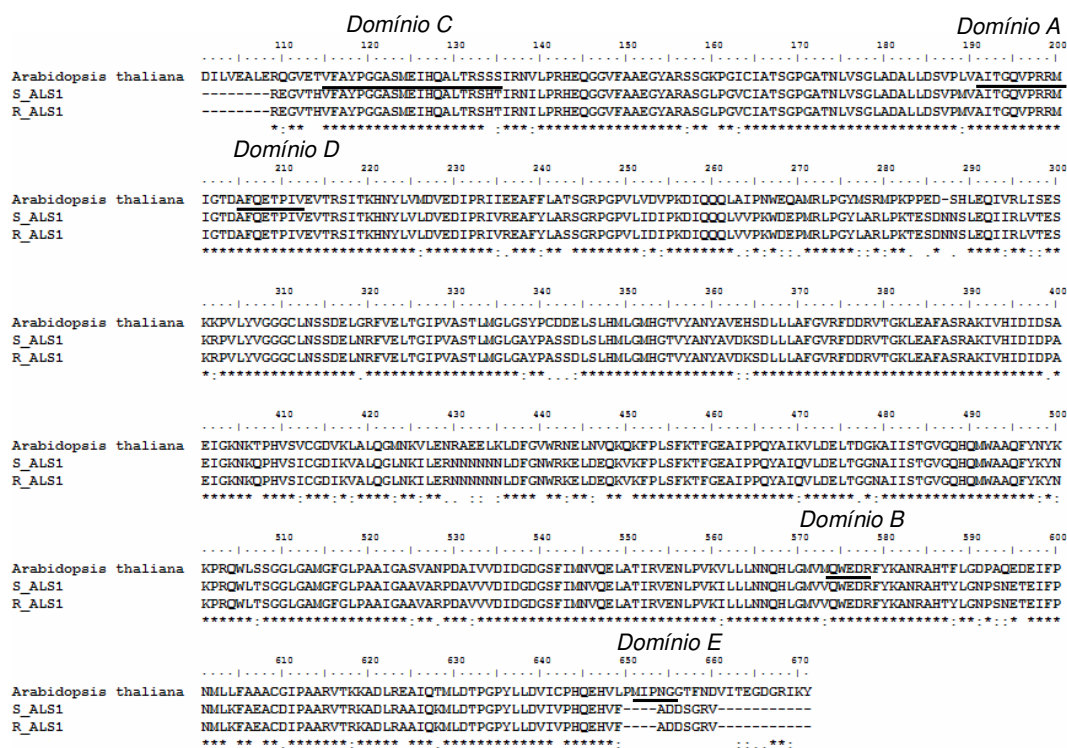


FIGURA 18. Alinhamento da seqüência de aminoácidos do alelo (ALS1) da enzima ALS dos biótipos suscetível (S_) e resistente (R_) de *Bidens subalternans*, com a seqüência do mesmo gene de *Arabidopsis thaliana* (seqüência protéica correspondente ao acesso X51514, GenBank). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007. Similaridades entre as seqüências estão representadas pelos asteriscos.

A hibridização radioativa com P³², através da técnica de *Southern Blot*, foi conduzida visando confirmar o número de alelos para a ALS, presentes na espécie poliplóide *B. subalternans*. O DNA dos biótipos R e S foi digerido com quatro enzimas de restrição. Entretanto, dificuldades durante a condução da técnica, não proporcionaram resultados em uma boa definição.

A digestão com a enzima BamHI, enzima testada com ausência de corte na seqüência do gene da ALS, confirmou a ocorrência de, pelo menos, três alelos do gene da ALS em *B. subalternans* (Figura 19). O alelo S_ALS3, correspondente aos domínios C, A, D, utilizado como sonda, hibridizou em pelo menos três fragmentos do DNA digerido. Este resultado confirma o número de

alelos previamente encontrados na clonagem do gene da ALS em *B. subalternans*.

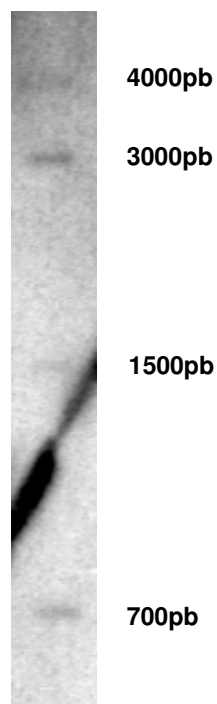


FIGURA 19. Análise da hibridização *Southern Blot* do gene da ALS em *Bidens subalternans*. DNA digerido com BamHI e a seqüência dos domínios C, A, D (S_ALS3), utilizada como sonda. Marcador 1Kb. University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.

4.3 Comparação de valores adaptativos

4.3.1 Crescimento relativo

Os biótipos S e R foram comparados quanto aos seus valores adaptativos em dois ensaios; o primeiro ensaio foi conduzido durante o ano de 2007, na University of Arkansas, e o segundo, em 2008, na UFRGS. No primeiro ensaio, a análise de variância demonstrou interação significativa entre biótipo x época ($p \leq 0,01$) apenas para a estatura de planta (Figura 20).

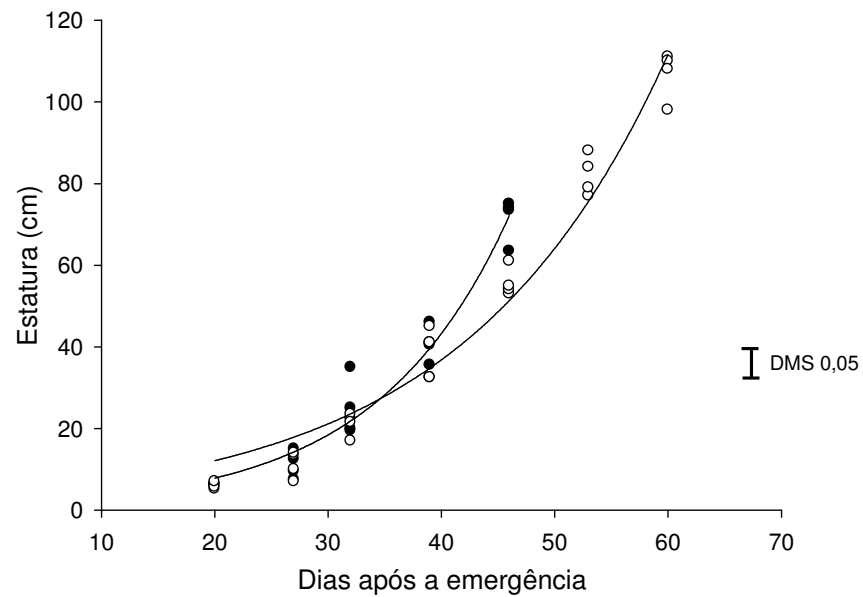


FIGURA 20. Estatura de planta dos biótipos de *Bidens subalternans* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS, avaliada semanalmente até o florescimento. University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007. (•) Suscetível; $Y=1,43 \cdot \exp(0,08 \cdot X)$; Coeficiente de determinação (R^2)=0,96; (o) Resistente; $Y=4,00 \cdot \exp(0,05 \cdot X)$; $R^2=0,97$.

No segundo ensaio, a análise dos dados através do teste F também demonstrou interação significativa entre biótipo x época ($p \leq 0,01$) para a variável estatura de planta (Figura 21). Em ambos os experimentos, o biótipo S floresceu em torno de 14 dias antes do R, ou seja, aos 46 DAE. Já, o biótipo R floresceu 60 DAE. Deste modo, para efeito de comparação entre os biótipos, serão estabelecidos 46 DAE como a última época de determinação.

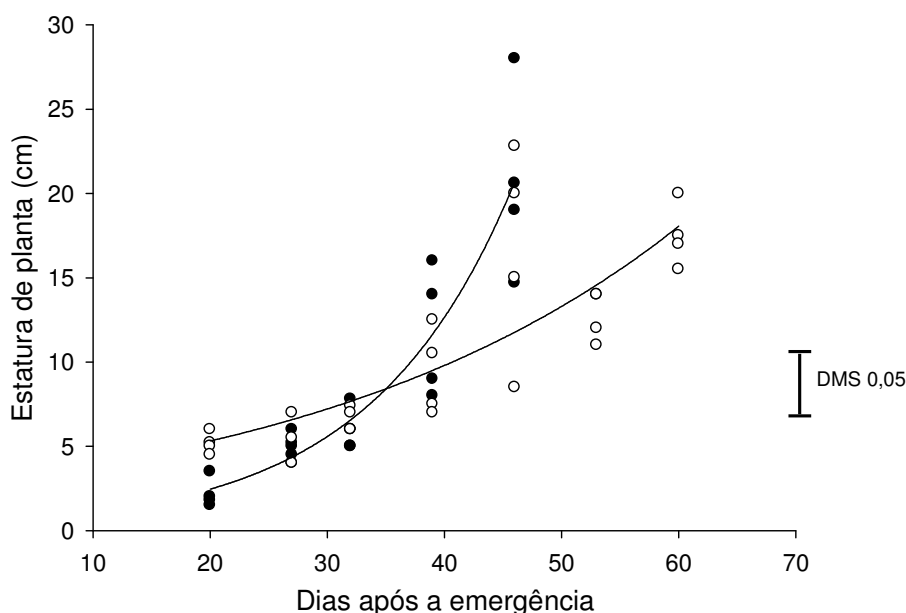


FIGURA 21. Estatura de planta de biótipos de *Bidens subalternans* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS, avaliada semanalmente até o florescimento. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008. (●) Suscetível; $Y=0,48 \cdot \exp(0,08 \cdot X)$; Coeficiente de determinação (R^2)=0,84. (○) Resistente; $Y=2,89 \cdot \exp(0,03 \cdot X)$; $R^2=0,65$.

O biótipo S foi superior, em valores absolutos, em estatura quando comparado ao R, aos 46 DAE. No primeiro ensaio, a estatura média do biótipo S foi equivalente a 71 cm enquanto que, para o R, a mesma equivalia a 56 cm (Figura 20). Já, no segundo ensaio, o S apresentou, em média, 20 cm enquanto que o R apresentou 17 cm (Figura 21) na mesma época de avaliação.

No ensaio 1, para as demais variáveis, MSPA, MSR, MST e a relação MSPA e MSR, o efeito simples para biótipos não foi significativo, o que indica que o acúmulo de massa seca apresentou comportamento semelhante para ambos os biótipos estudados. Este resultado é sustentado pela falta de significância para o teste “t” realizado para taxa de crescimento relativo, em ambos os ensaios. No ensaio 2, a exceção foi a relação MSPA e MSR, onde a interação biótipo x época foi significativa ($p \leq 0,05$).

Os dados referentes à MSPA para ambos os ensaios, são apresentados pelas Figuras 23 e 24. A MSPA média dos biótipos equivaleu a 1452,5 mg planta⁻¹ no ensaio 1, quando da última avaliação aos 46 DAE (Figura 22).

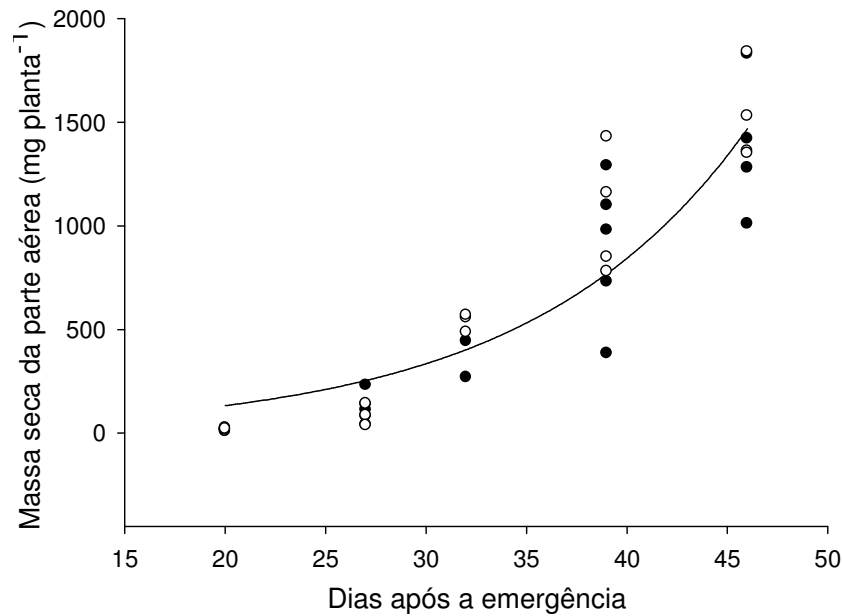


FIGURA 22. Massa seca da parte aérea dos biótipos de *Bidens subalternans* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS. University of Arkansas, Fayetteville – AR, 2007. (●) Suscetível; (○) Resistente; $Y=20,92 \cdot \exp(0,09 \cdot X)$; Coeficiente de determinação (R^2)=0,88.

Para o ensaio 2, a MSPA apresentou valor equivalente a 577,9 mg planta⁻¹ na última avaliação realizada aos 46 DAE (Figura 23).

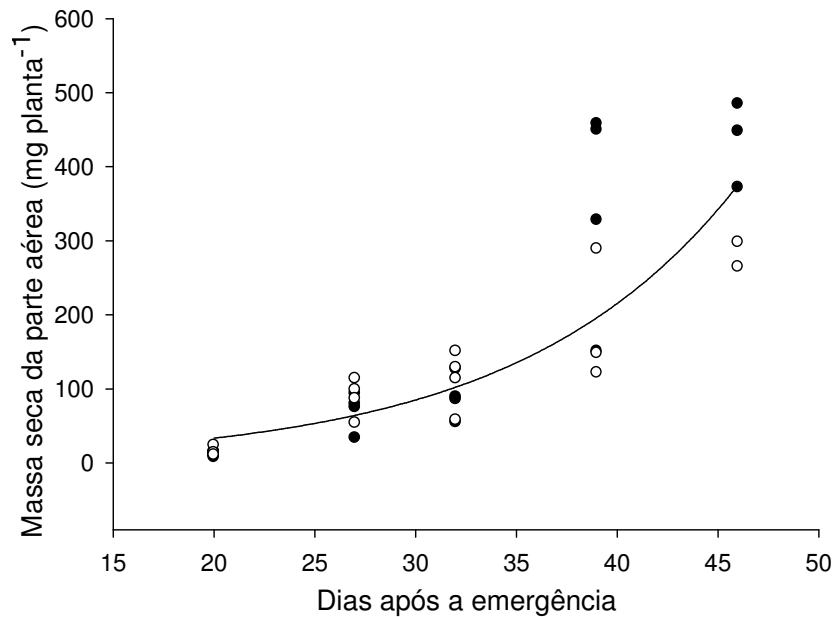


FIGURA 23. Massa seca da parte aérea dos biótipos de *Bidens subalternans* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008. (●) Suscetível; (○) Resistente; $Y=5,27 \cdot \exp(0,09 \cdot X)$; Coeficiente de determinação (R^2)=0,83.

Para a MSR no ensaio 1, o valor médio quando da última avaliação foi correspondente a 496,2 mg planta⁻¹ (Figura 24), enquanto que, no ensaio 2, este valor equivaleu a 78,7 mg planta⁻¹ (Figura 25). Embora divergentes em valores absolutos quando comparados os ensaios, o comportamento entre os biótipos em ambos foi semelhante.

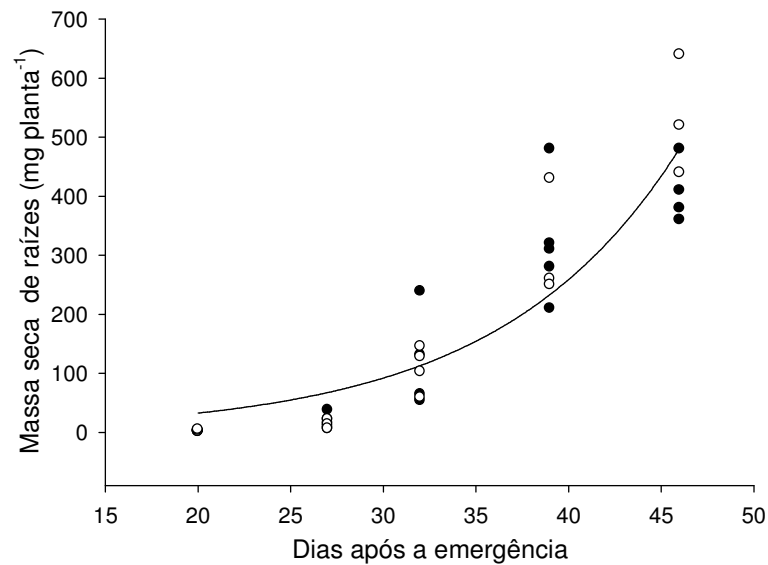


FIGURA 24. Massa seca de raízes dos biótipos de *Bidens subalternans* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS. University of Arkansas, Fayetteville – AR, 2007. (●) Suscetível; (○) Resistente; $Y=4,13 \cdot \exp(0,10 \cdot X)$; Coeficiente de determinação (R^2)=0,86.

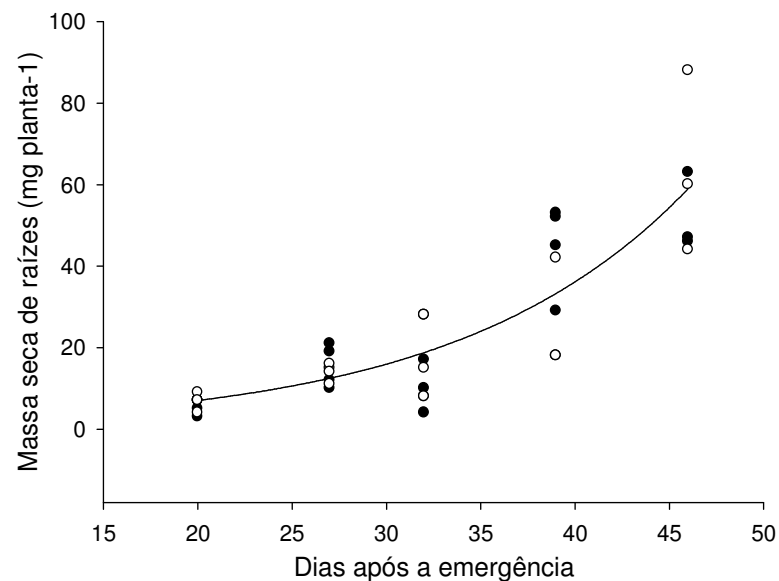


FIGURA 25. Massa seca de raízes dos biótipos de *Bidens subalternans* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008. (●) Suscetível; (○) Resistente; $Y=1,37 \cdot \exp(0,08 \cdot X)$; Coeficiente de determinação (R^2)=0,76.

As MST em ambos os ensaios são apresentadas pelas Figuras 26 e 27. Aos 46 DAE, nos ensaios 1 e 2, a MST equivaleu, em média, a 1948,9 e 656,6 mg planta⁻¹, respectivamente. Cabe lembrar que ambos os ensaios foram conduzidos em condições controladas, mas em locais diferentes. Deste modo, justificam-se as diferenças de valores em magnitude, observadas entre os mesmos.

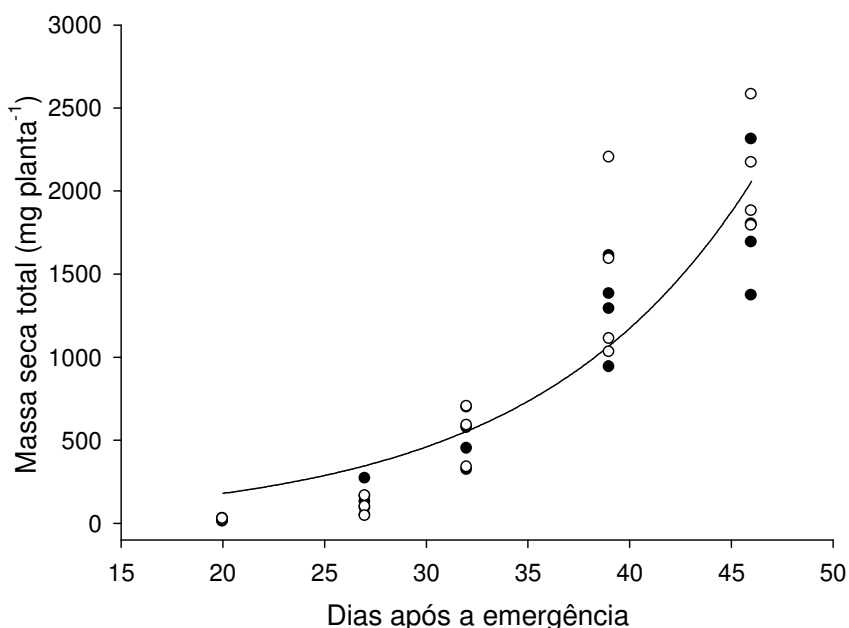


FIGURA 26. Massa seca total de *Bidens subalternans* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS. University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007. (•) Suscetível; (o) Resistente; $y=8,23*\exp(0,09*x)$; Coeficiente de determinação (R^2)=0,75.

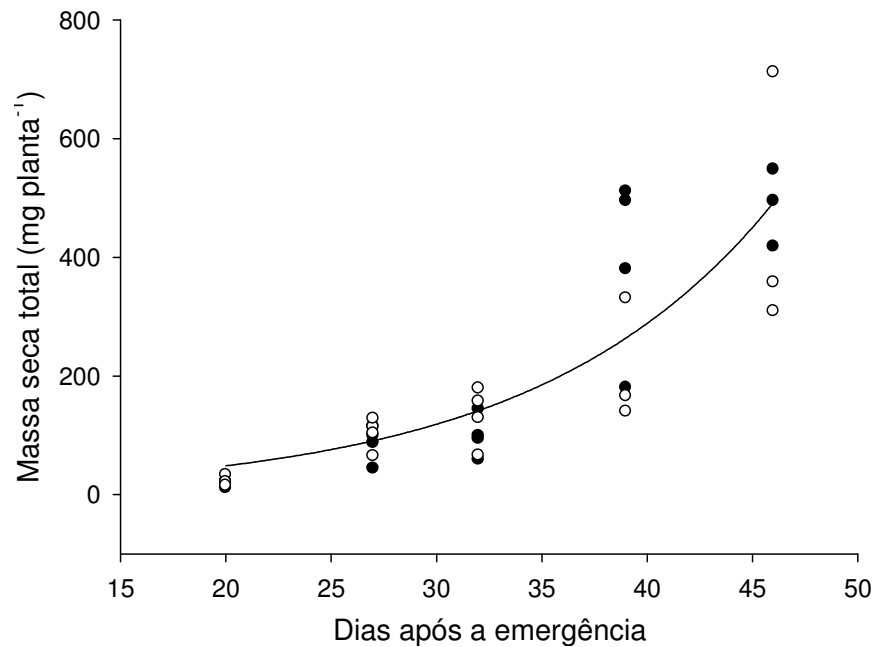


FIGURA 27. Massa seca total de *Bidens subalternans* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS. UFRGS, Porto Alegre - RS, 2008. (●) Suscetível; (○) Resistente; $y=27,71*\exp(0,09*x)$; Coeficiente de determinação (R^2)=0,84.

No ensaio 1, os biótipos S e R apresentaram comportamento similar quanto à relação MSPA e MSR. Neste ensaio, conforme esperado, a relação indicou que ambos os biótipos apresentaram, inicialmente, maior MSPA. Conforme o avanço do desenvolvimento das plantas, esta relação diminuiu, havendo maior incremento da MSR quando da última avaliação aos 46 DAE (Figura 28).

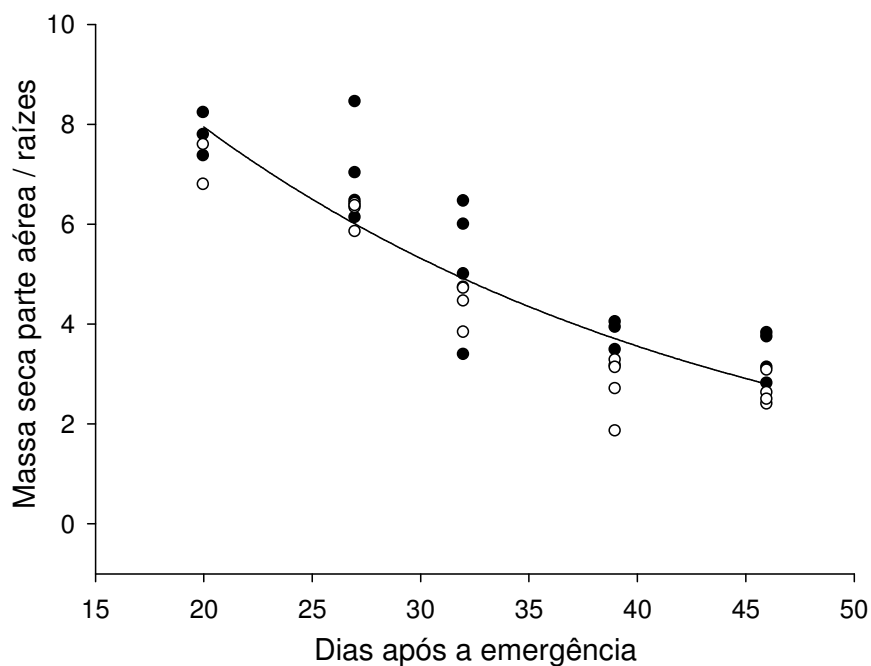


FIGURA 28. Relação da massa seca da parte aérea e raízes de *Bidens subalternans* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS. University of Arkansas, Fayetteville – AR, 2007. (●) Suscetível; (○) Resistente; $y=17,74 \cdot \exp(0,04 \cdot x)$; Coeficiente de determinação (R^2)=0,81.

No segundo ensaio, a relação MSPA e MSR demonstrou comportamento inverso aquele apresentado no Ensaio 1. Os biótipos demonstraram maior investimento em MSPA em relação à MSR.

4.3.2 Germinação das sementes

Para o ensaio 1, conduzido na University of Arkansas, em 2007, a análise de variância para a germinação acumulada indicou interação significativa para efeito de biótipo x tempo (dias) ($p \leq 0,01$). Os dados foram ajustados ao modelo log-logístico (Figura 29).

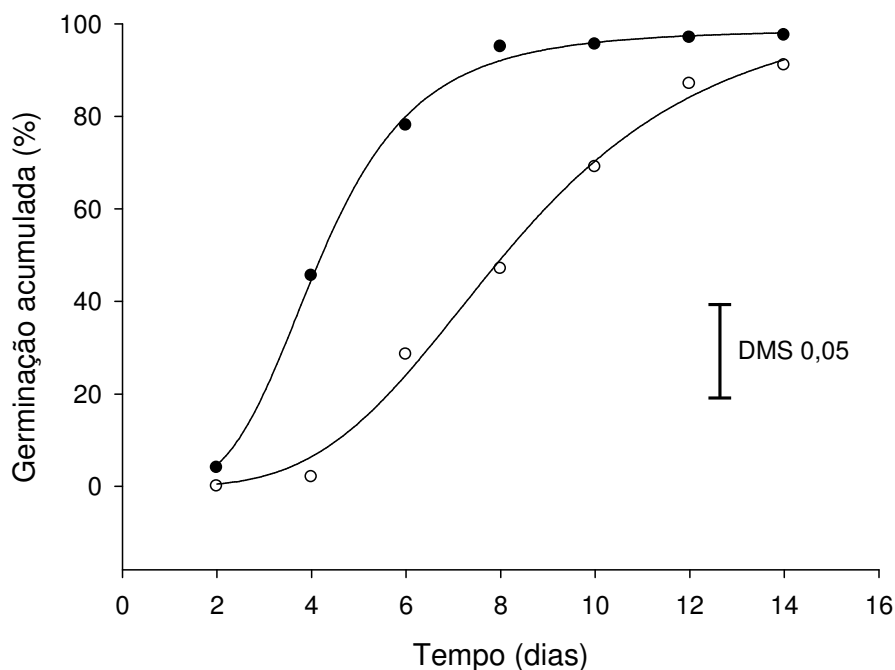


FIGURA 29. Germinação acumulada das sementes de *Bidens subalternans* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS, submetidas às temperaturas de 28/25°C. University of Arkansas, Fayetteville – AR, 2007. (●) Suscetível; $(y=98,78/[1+(x/4,19)^{-4,05}]$; Coeficiente de determinação (R^2)=0,99. (○) Resistente; $(y=105,14/[1+(x/8,28)^{-3,73}]$; $R^2=0,99$.

No primeiro ensaio de germinação, o biótipo S apresentou praticamente 100% de germinação oito dias após as sementes serem postas a germinar (Figura 29). O biótipo R, no entanto, atingiu 90% de germinação somente aos 14 dias (Figura 29). Metade das sementes suscetíveis germinou em pouco mais de quatro dias, sendo necessário, pelo menos, o dobro do tempo para que as resistentes atingissem 50% de germinação.

O teste “t” demonstrou diferenças entre os biótipos para tempo médio de germinação (MLIT), taxa de germinação (TG) e coeficiente de velocidade de germinação (CVG) no primeiro ensaio (Tabela 10). O biótipo S apresentou

MLIT inferior ao R; em média, foram necessários cinco dias para as sementes S germinarem enquanto que, para o R, a média foi de nove dias (Tabela 10).

Os biótipos diferiram quanto à TG; S e R apresentaram, em média, respectivamente, taxas de germinação correspondentes a cinco e três sementes/dia (Tabela 10). O CVG também foi superior para o biótipo S quando comparado ao R. Estes resultados confirmam as respostas observadas nas curvas de germinação (Figura 29), indicando que, em geral, o biótipo S germinou mais rapidamente que o R. Por outro lado, não foram observadas diferenças para o peso de 100 sementes entre os biótipos (Tabela 10).

TABELA 10. Tempo médio de germinação (dia), taxa de germinação (semente/dia), coeficiente de velocidade de germinação (%) e peso de sementes de *Bidens subalternans* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS. University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.

Biótipos	MLIT^a	TG^b	CVG^c	Peso de 100 sementes (mg)
Suscetível	5,41 * ^d	5,03 *	19,29 *	257,25 ns
Resistente	8,81	2,81	11,85	271,50

^a Tempo médio de germinação (dia).

^b Taxa de germinação de Maguire (semente/dia).

^c Coeficiente de velocidade de germinação de Kotowski (%).

^d Médias seguidas de asteriscos indicam significância pelo teste “t” ao nível de 1% de probabilidade do erro experimental; ns = ausência de significância.

No segundo ensaio de germinação, a análise dos dados pelo teste F demonstrou interação significativa entre biótipos x tempo x temperatura ($p \leq 0,05$) para a germinação acumulada. Os dados foram ajustados ao modelo log-logístico (Tabela 11). Na condição de menor temperatura avaliada, ou seja, 15,1°C, o biótipo R mostrou desempenho inicial superior ao S (Figura 30).

TABELA 11. Parâmetros da equação^a utilizada para calcular o tempo (dias) requerido para obter 60% de germinação (X_{60}) das sementes dos biótipos de *Bidens subalternans* suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da ALS. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008.

Temperatura	Biótipo	a	b	Xa_{50}	X_{60} ^b	R ²	Itr ^c
15,1	S	84,6	-7,78	4,73	5,31	0,99	17
	R	85,3	-4,18	3,43	4,22	1,0	16
20,2	S	60,4	-3,67	2,84	11,5	0,99	16
	R	20,7	-1,41	1,38	--- ^d	0,99	33
22,8	S	80,3	-4,26	2,28	2,95	0,99	18
	R	102,4	-2,25	3,96	4,63	0,96	18
28,7	S	93,3	-3,07	3,70	4,50	0,98	18
	R	82,9	-4,01	3,76	4,80	0,98	22
32,6	S	68,0	-91,2	7,11	7,27	1	200
	R	88,0	-97,1	8,74	8,81	1	200

^a Equação logística $Y = a / (1 + ((x/Xa_{50})^b))$.

^b Tempo necessário para obter 60% de germinação das sementes.

^c Itr = número de iterações utilizadas para ajustar os parâmetros da equação.

^d --- Valor não determinado porque a germinação máxima obtida foi 20,7%.

De acordo com os resultados, 60% das sementes do biótipo S germinaram na temperatura de 22,8°C, em 3 dias (Tabela 11). Nesta temperatura, o biótipo R, precisou de 5 dias para atingir o mesmo percentual de germinação. Entretanto, na condição extrema de menor temperatura, 15,1°C, o biótipo R necessitou de 4 dias para atingir 60% de germinação quando comparado aos 5 dias gastos pelo S, na mesma condição de temperatura.

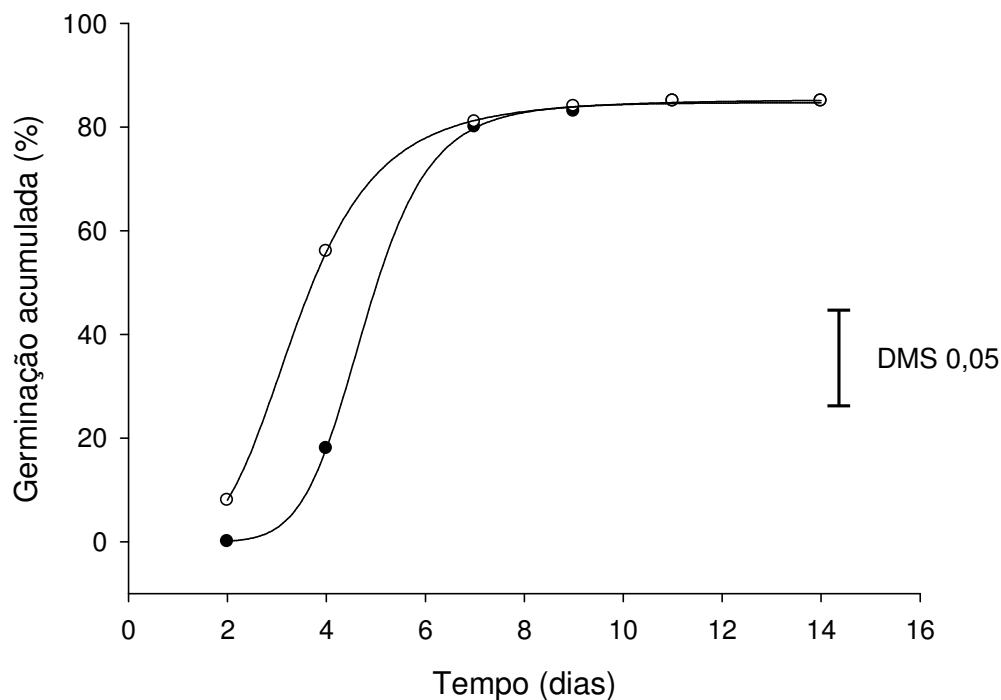


FIGURA 30. Germinação acumulada das sementes de *Bidens subalternans* suscetível (●) e resistente (○) aos herbicidas inibidores da ALS, quando submetidas à temperatura de 15,1°C. As equações e os parâmetros são apresentados na Tabela 11. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008.

O teor dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina nas sementes, expresso em valores percentuais em relação ao conteúdo total de aminoácidos, foi de 4,9%, 4,1% e 4,9%, respectivamente, para o biótipo S. Para o R, estes percentuais foram da ordem de 5,4%, 4,1% e 5,4%, respectivamente, para os mesmos aminoácidos. Assim, o conteúdo percentual de valina e isoleucina foi 10% superior nas sementes do biótipo R quando comparado ao S. Entretanto, cabe ressaltar que não foi possível a repetibilidade do método utilizado, em função da quantidade reduzida de sementes para compor as amostras representativas de cada biótipo.

4.3.3 Série de substituição

A análise gráfica do experimento em série de substituição, onde foi avaliada a MSPA dos biótipos S e R, é apresentada pela Figura 31. Observa-se que os biótipos S e R apresentaram variações nas PR nas diferentes proporções, mas os desvios das PR das retas hipotéticas não foram significativos. A exceção foi a proporção 50:50 (R:S) para o biótipo S, com redução na PR da MSPA (Tabela 12).

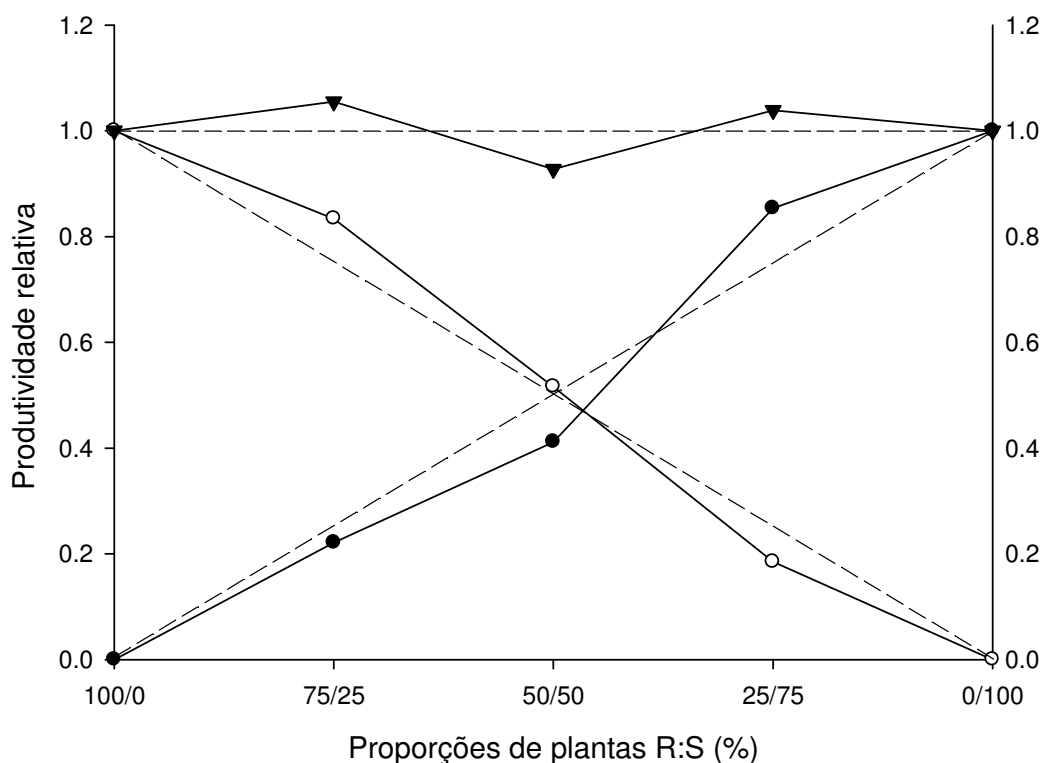


FIGURA 31. Produtividade relativa (PR) e total (PRT) para massa seca da parte aérea (MSPA) dos biótipos de *Bidens subalternans* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS. University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007. Círculos cheios (●) e vazios (○) representam a PR da MSPA do biótipo S e do R, respectivamente, e (▼) indica a PRT. As linhas tracejadas referem-se às produtividades relativas hipotéticas, quando não ocorre interferência de um biótipo sobre o outro.

TABELA 12. Diferenças relativas de produtividade (DPR) para a variável massa seca da parte aérea, e produtividade relativa total (PRT), nas proporções 75:25, 50:50 e 25:75 de plantas dos biótipos de *Bidens subalternans* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS, associados. University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.

	Proporções de plantas (resistente:suscetível)		
	75:25	50:50	25:75
	Massa seca da parte aérea		
Resistente	0,08 ($\pm 0,07$) ^{ns}	0,02 ($\pm 0,02$) ^{ns}	-0,07 ($\pm 0,03$) ^{ns}
Suscetível	-0,03 ($\pm 0,03$) ^{ns}	-0,09 ($\pm 0,02$) [*]	-0,10 ($\pm 0,03$) ^{ns}
Total	1,05 ($\pm 0,09$) ^{ns}	0,93 ($\pm 0,02$) ^{ns}	1,04 ($\pm 0,06$) ^{ns}

^{ns} Não significativo e ^{*} significativo pelo teste "t" ($p \leq 0,05$). Valores entre parênteses representam o erro padrão da média.

A PRT não apresentou diferenças significativas (Tabela 12). Entretanto, ela apresentou desvios superiores a 1 nas proporções 75:25 (R:S) e 25:75 (R:S), e inferior a 1, quando os biótipos se equivaleram (50:50).

Os biótipos não apresentaram diferenças quanto ao crescimento relativo (CR), indicando que o crescimento comparativo dos biótipos não foi afetado (Tabela 13). Também não foram observadas diferenças quanto aos coeficientes de competitividade (A), demonstrando não haver superioridade de um biótipo sobre o outro. Todavia, os coeficientes de agrupamento relativo (K) foram significativos, com valor superior ao biótipo R (Tabela 13).

TABELA 13. Índices de competitividade entre biótipos de *Bidens subalternans* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS, expressos por competitividade relativa (CR) e coeficientes de agrupamento relativo (K) e de competitividade (A). University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.

	CR	K _{R = resistente}	K _{S = suscetível}	A
MSPA ¹	1,27 ($\pm 0,10$) ^{ns}	1,07 ($\pm 0,09$) [*]	0,70 ($\pm 0,06$) [*]	0,10 ($\pm 0,03$) ^{ns}

¹ Massa seca da parte aérea seca.

^{*} Significativo e ^{ns} não significativo pelo teste "t" ($p \leq 0,05$). Valores entre parênteses representam os erros padrões das médias.

A convivência dos biótipos em relação à MSPA demonstrou que a competição intra-específica foi mais vantajosa para o R (Tabela 14). As

maiores médias por planta para o biótipo R foram observadas quando ele esteve sozinho ou em populações superior ou similar ao S. Em relação ao biótipo S, não houve diferença para MSPA na resposta à interferência (Tabela 14).

TABELA 14. Resposta à interferência dos biótipos de *Bidens subalternans* suscetível (S) e resistente (R) aos herbicidas inibidores da ALS, 42 dias após a emergência. University of Arkansas, Fayetteville - AR, 2007.

	Proporções de plantas (R:S)					CV (%)	Média
	100:0 (R)	75:25	50:50	25:75	0:100(S)		
Matéria da parte aérea seca							
Biótipo Resistente	1,56	1,74	1,61	1,15*	-	15,9	1,51
Biótipo Suscetível	-	1,13	1,05	1,45	1,28 ^{ns}	15,2	1,21

* Significativo e ^{ns} não significativo em relação à testemunha (R ou S) pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

4.4 Genética da resistência

4.4.1 Contagem de cromossomos

Foram realizados dois tipos de análises cromossômicas. Inicialmente, foi observada a meiose e, posteriormente, procedeu-se à contagem do número de cromossomos na mitose para *B. subalternans*. Optou-se por também contar os cromossomos da espécie *Bidens pilosa*, devido à identificação errônea que existe entre as duas espécies na prática.

Na análise inicial realizada na meiose, foi possível observar a ocorrência de 12 quadrivalentes na metáfase I (Figura 32). Os números cromossômicos observados para ambos os biótipos (S e R) analisados na espécie *B. subalternans* foram $2n=48$. Para a espécie *B. pilosa*, o número encontrado foi $2n=72$ (Figura 33). Os resultados confirmam que, embora similares à *Bidens pilosa* em alguns aspectos nos estádios iniciais de desenvolvimento, os

biótipos avaliados neste estudo pertencem à espécie *Bidens subalternans* e possuem o número cromossômico $2n=48$.

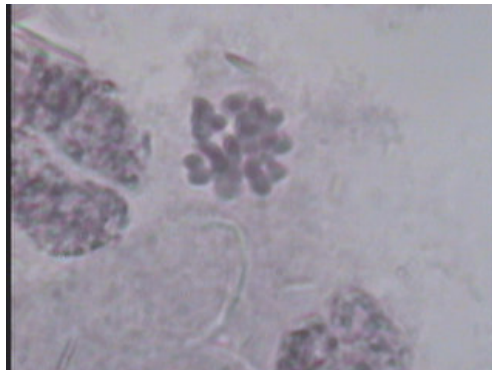


FIGURA 32. Célula meiótica de *Bidens subalternans*, metáfase I. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2006. Escala 10 μ m.

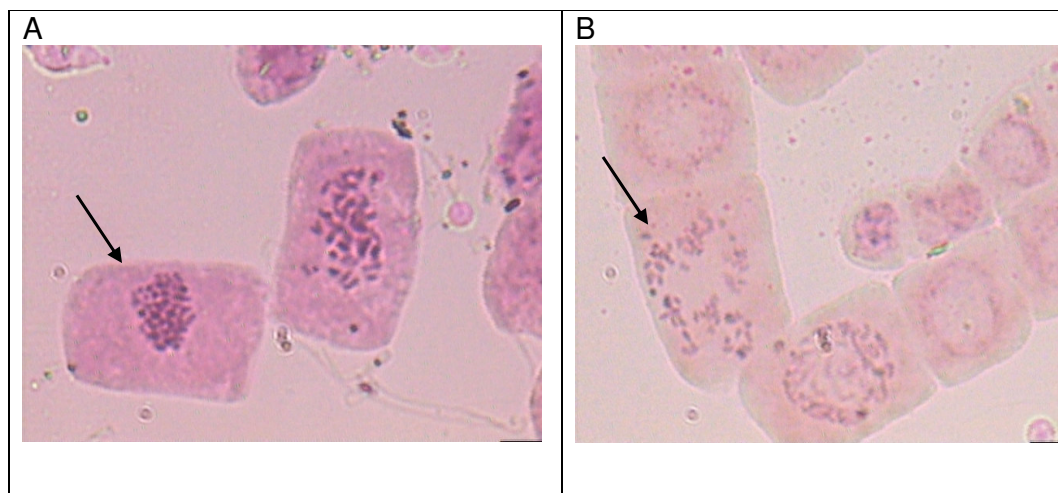


FIGURA 33. Metáfases mitóticas. (A) *Bidens subalternans* ($2n=48$). (B) *Bidens pilosa* ($2n=72$). UFRGS, Porto Alegre – RS, 2006. Setas indicam células usadas para contagem dos cromossomos. Escala 10 μ m.

4.4.2 Estudo de herança genética

A técnica desenvolvida para o cruzamento entre os biótipos de *B. subalternans* mostrou-se adequada para geração das sementes F1 (Figura 34). Na primeira etapa para obter as sementes F1, conduzida na UFRGS, em 2006,

foram realizados 99 cruzamentos. Dos cruzamentos realizados, 58 envolveram SxR e 41=RxS. Foram produzidas no total 23 sementes F1 (17=SxR e 6=RxS). Dentre as 23 sementes produzidas, cinco mostraram-se inviáveis.

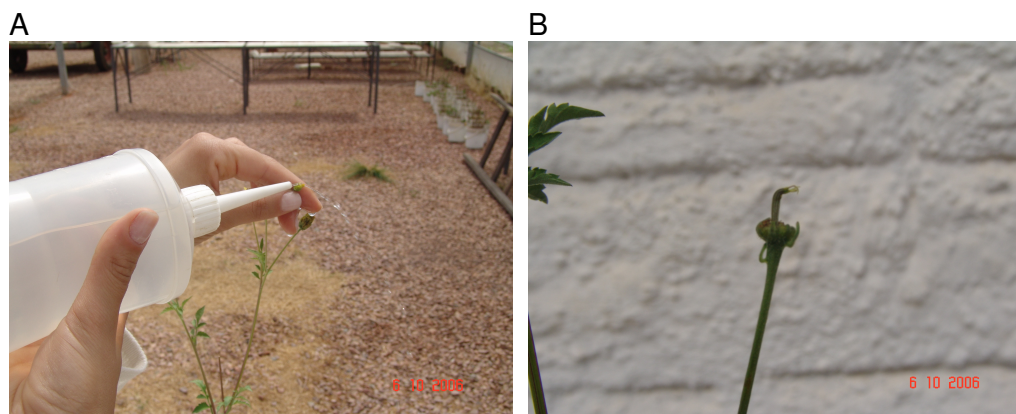


FIGURA 34. Cruzamentos em *Bidens subalternans*. (A) Lavagem da flor que irá receber pólen de outra planta. (B) Semente F1, oriunda do cruzamento SxR. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2006.

Dezoito sementes F1 foram pré-germinadas e transplantadas para vasos, para serem crescidas em casa de vegetação. A primeira semente F1 pré-germinada (um cruzamento RxS) foi transplantada em 23/11/2006. Devido à época ser a ideal para o desenvolvimento de *B. subalternans*, a planta apresentou rápido crescimento e floresceu na primeira semana de janeiro/07. Deste modo, na metade de fevereiro/07, sementes F2 maduras começaram a serem colhidas. Todas as sementes F2 geradas foram colhidas, secas à temperatura ambiente e armazenadas em geladeira, para posterior análise da herança genética.

Das dezoito sementes F1 germinadas, quatro plântulas, crescidas em condições semelhantes às demais, apresentaram comportamento dissimilar. Repentinamente, sem nenhum sintoma evidente, as plântulas morreram. O

detalhe é que as mesmas não foram além da produção de duas folhas verdadeiras. Paralelo a este evento, uma falha elétrica na geladeira onde as sementes estavam armazenadas, comprometeu toda a geração F2 produzida, não restando nenhuma semente para o avanço no estudo de herança genética.

A segunda etapa de cruzamentos, realizada na University of Arkansas em 2007, foi uma tentativa de obter novas sementes F2 em tempo hábil de conduzir o estudo de herança genética. Foi possível a realização de 45 cruzamentos entre os biótipos, sendo 24=SxR e 21=RxS. Foram obtidas, com sucesso, sete sementes F1 dos cruzamentos SxR e cinco sementes oriundas de RxS. Entretanto, desta vez, as 12 sementes F1 produzidas apresentaram o mesmo sintoma daquelas da primeira geração F1 (UFRGS, 2006), ou seja, ao serem transplantadas após pré-germinadas, produziram até duas folhas verdadeiras e em seguida morreram, sem nenhum sintoma evidente. Portanto, o estudo de herança genética ficou inviável, em função da falta de tempo hábil para geração de sementes F1 e conseqüentemente, F2.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho propôs-se a estudar a resistência aos inibidores de ALS em *B. subalternans*, avaliando níveis de resistência na planta e na enzima, identificando a base molecular da resistência e comparando valores adaptativos entre os biótipos resistente e suscetível.

5.1. Confirmação da espécie

A primeira etapa desta pesquisa consistiu na confirmação de que os biótipos S e R selecionados para estudo pertencem à espécie *Bidens subalternans*. Para isto, análises citogenéticas foram conduzidas (item 4.4.1). As análises citogenéticas realizadas confirmam que os biótipos S e R são da espécie *B. subalternans* (Figura 33) e estão de acordo com dados de Grombone-Guaratini *et al.* (2006). Segundo os autores, *B. pilosa* é hexaplóide com $2n=72$ e *B. subalternans* é tetraplóide com $2n=48$. A ocorrência de quadrivalentes na meiose, observada na Figura 32, pode refletir homologia entre os cromossomos devido à origem poliplóide da espécie (Stebbins, 1971).

É sabido que o número cromossômico básico para o gênero *Bidens* é $n=12$ (Ballard, 1986). Em *Bidens pilosa*, foram encontrados números cromossômicos equivalentes a $2n=48$, 70 e 72 (Mariano & Marin-Morales, 1999). Entretanto, a existência de duas espécies, *B. pilosa* e *B. subalternans*,

também é suportada por Magenta (1998) e Mondin (2004). *Bidens subalternans* e *Bidens pilosa* ocorrem concomitantemente nas lavouras e possuem características morfológicas muito semelhantes, especialmente em estádios iniciais de desenvolvimento. Este fato gera confusão na identificação e separação das duas espécies.

5.2. Curvas de dose-resposta e ensaios enzimáticos

5.2.1 Curvas de dose-resposta sobre crescimento de planta

No presente trabalho, estes ensaios foram conduzidos com o intuito de confirmar a resistência previamente observada a campo e avaliar níveis de resistência aos inibidores de ALS em biótipo de *B. subalternans*. Fatores de resistência elevados, calculados a partir de valores do C_{50} observados no Ensaio 1, confirmam a resistência aos inibidores da ALS pelo biótipo R. Os resultados obtidos também demonstram a ocorrência de resistência cruzada aos grupos das sulfoniluréias, imidazolinonas, pirimidil-benzoatos e sulfonanilidas (Tabela 5; Figura 3). Resultados semelhantes foram observados por Vargas *et al.*, (1999), Burgos *et al.*, (2001) e Christoffers *et al.*, (2006).

Os valores de C_{50} dos biótipos R e S observados neste trabalho e utilizados para o cálculo dos fatores de resistência, foram obtidos a partir dos modelos log-logístico e sigmoidal. Segundo Seefeldt *et al.* (1995), eles melhor representam através de curvas de dose-resposta, o comportamento dos biótipos em função de doses herbicidas. Entretanto, o C_{50} estimado pelos modelos não representa o valor real que controla em 50% os biótipos. Isso ocorre porque os valores estimados pelos modelos são baseados na assíntota de máxima (parâmetro “a”) fornecida pelos mesmos. Para evitar confundimento,

neste estudo foi estabelecido que o valor calculado pela equação do modelo é chamado de “ Xa_{50} ”. Deste modo, o C_{50} real foi obtido das iterações realizadas para ajustar os dados, representando de forma real, a dose necessária para controlar em 50% os biótipos. O C_{50} e não o Xa_{50} utilizado para o cálculo dos fatores de resistência. O mesmo procedimento foi adotado para GR_{50} e I_{50} .

O fato de não ser atingido, pelo menos, 50% de controle do biótipo R no Ensaio 1, justificou a necessidade da condução de um segundo experimento (Ensaio 2) com doses mais elevadas, onde a dose máxima avaliada correspondeu a 64 vezes a dose de rótulo. Resultados semelhantes aos do Ensaio 1 foram observados para o Ensaio 2 (Tabelas 5 vs. 6). Entretanto, no segundo experimento, chlorimuron-ethyl é o herbicida, em valores absolutos, com menor FR, situação diferente daquela observada no Ensaio 1, onde imazethapyr foi o composto com FR menor. O fato do estágio mais avançado das plantas quando da aplicação no Ensaio 1 pode ter dificultado o desempenho por parte do imazethapyr, alterando o FR do mesmo e de chlorimuron-ethyl para o biótipo R. Fato semelhante foi relatado por Burgos *et al.* (2001) para imazaquin em *Amaranthus palmeri*. De acordo com os autores, dois ensaios foram conduzidos e a redução da atividade herbicida observada no segundo experimento foi atribuída ao maior estágio das plantas quando da aplicação dos herbicidas.

De maneira geral, os FR observados em ambos os ensaios, são superiores aqueles apresentados pela literatura para *B. subalternans*. Gelmini *et al.* (2002) observaram em biótipo de *B. subalternans* originário de São Gabriel do Oeste, MS, FR superiores a 22 e 26 para chlorimuron-ethyl e imazethapyr, respectivamente. López-Ovejero *et al.* (2006) relatam FR para os

mesmos herbicidas equivalentes a 25 e 11, respectivamente, em biótipo R originário de São Paulo. Biótipo de *B. subalternans* do Rio Grande do Sul apresentou FR equivalentes a 54 e 487 para imazethapyr e cloransulam-methyl, respectivamente (Pinto *et al.*, 2006). Em geral, os níveis de resistência observados são consequência da pressão de seleção imposta por um herbicida principal, responsável por selecionar mutações especialmente relacionadas com seu grupo químico (Tranel & Wright, 2002). Deste modo, é possível atribuir a grande diversidade de resultados observados na literatura a diferentes mecanismos de resistência (mutações).

Semelhante aos resultados encontrados para o biótipo R de *B. subalternans* (Tabela 7), a resistência a chlorimuron-ethyl, pyriithiobac-sodium, diclosulam e imazaquin em *Amaranthus palmeri* também foi elevada, quando os FR foram calculados a partir dos valores do GR₅₀ (Burgos *et al.*, 2001). Neste caso, os FR equivaleram a 74, 117, 39 e >130 para chlorimuron-ethyl, pyriithiobac-sodium, diclosulam e imazaquin, respectivamente. No entanto, FR mais baixos (também a partir do GR₅₀), da ordem de 22 e 12, respectivamente, foram observados para chlorimuron-ethyl e imazethapyr, em biótipo R de *B. subalternans* originário de São Paulo (López-Ovejero *et al.*, 2006). Já, Gelmini *et al.* (2002), reportaram FR para chlorimuron-ethyl e imazethapyr correspondentes a >86 e >27, respectivamente para *B. subalternans*.

Neste trabalho, surpreendentemente, em valores absolutos, o maior nível de resistência foi observado ao grupo dos pirimidil-benzoatos. Na área onde o biótipo R foi selecionado, a soja é a principal cultura, sendo os herbicidas chlorimuron-ethyl, imazethapyr e cloransulam-methyl utilizados a pelo menos dez anos. Entretanto, é comum a prática da rotação com a cultura

do algodão, já mencionada anteriormente. Assim, pyriithiobac-sodium passa a ser um agente de seleção adicional utilizado na cultura algodão. Deste modo, mesmo quando da rotação de culturas, as plantas daninhas estariam expostas à pressão de seleção de outro inibidor de ALS. Diversos trabalhos têm demonstrado que biótipos resistentes a estes inibidores, têm resistência cruzada aos herbicidas que pertencem ao mesmo grupo químico daquele herbicida responsável pela seleção para a resistência e, também, diferentes níveis de resistência aos demais grupos herbicidas pertencentes ao mesmo mecanismo de ação (Burgos *et al.*, 2001; Rizzardi *et al.*, 2002; Burgos & Kuk, 2007).

De acordo com os resultados observados, confirmou-se a hipótese de que havia resistência aos inibidores da ALS no biótipo de *B. subalternans*. Além disto, os elevados FR observados sugerem local de ação dos herbicidas insensível e decidiu-se avaliar a atividade enzimática para confirmar esta suspeita.

5.2.2 Ensaio enzimáticos

Resistência aos quatro grupos químicos de inibidores de ALS foi comprovada no presente trabalho, através da comparação da atividade da enzima entre os biótipos R e S (Tabela 8; Figura 6). Estes resultados confirmam que a resistência no biótipo R de *B. subalternans* ocorre devido a uma ALS insensível, e estão de acordo com aqueles apresentados por Burgos *et al.* (2001), Kuk *et al.* (2003) e Uchino *et al.* (2007). Utilizando protocolo semelhante, biótipos de *Xanthium strumarium*, *B. pilosa* e *Amaranthus*

quitensis foram diagnosticados como suscetível e resistente aos inibidores de ALS (Gerwich *et al.*, 1993; Monquero & Christoffoleti, 2001).

O protocolo adotado nesta pesquisa mede a atividade da ALS através dos níveis de acetoína nas plantas (Gerwich *et al.*, 1993). A acetoína é resultado da descarboxilação do acetolactato acumulado em função da inibição ou não da ALS. Assim como para o método *in vitro*, o protocolo *in vivo* utilizado neste estudo apresenta algumas limitações. Para ensaios *in vitro*, por exemplo, no caso da resistência ser puramente metabólica, a planta não será controlada no campo, mas será diagnosticada como suscetível pelo bioensaio (Kuk *et al.*, 2003). Já para o ensaio *in vivo*, outras fontes de acetoína podem ocorrer na planta, ou ainda, deve-se considerar a possibilidade da enzima KARI insensível ao inibidor CPCA; neste caso, ambos fatores são possíveis de causar confundimento nos resultados.

Apesar de apresentarem o mesmo padrão de resistência (pyrithiobac-sodium > cloransulam-methyl > imazethapyr > chlorimuron-ethyl) em valores absolutos, ensaios enzimáticos e de curva de dose-resposta sobre crescimento de planta apresentam magnitudes diferentes quanto aos FR (Tabelas 5 e 8). Estas variações têm sido observadas por outros autores comparando os mesmos tipos de ensaios (Burgos *et al.*, 2001; Kuk *et al.*, 2003; Hanson *et al.*, 2004). Em *Camelina microcarpa*, o biótipo suscetível foi 10000 vezes mais sensível do que o resistente para chlorsulfuron, de acordo com ensaio de dose-resposta. Mas, no ensaio enzimático, o biótipo resistente demonstrou 111 vezes mais resistência que o suscetível para o mesmo herbicida (Hanson *et al.*, 2004).

Outra forma de explorar a resistência através de estudos enzimáticos seria a análise da atividade da ALS, medindo constantes cinéticas como K_m e V_{max} enzimáticos. Ensaio conduzido por Vargas *et al.* (1999) demonstraram diferenças no K_m entre os biótipos de leiteira suscetível e resistente aos inibidores da ALS. Sales *et al.* (2008) também relatam diferenças quanto à afinidade do substrato pela enzima quando comparados biótipos de arroz-vermelho suscetíveis e resistentes aos inibidores da ALS.

Os resultados obtidos, a partir dos ensaios de dose-resposta sobre crescimento de planta e enzimáticos confirmam a hipótese desta pesquisa de que o biótipo R de *B. subalternans*, oriundo de Jataí, GO, apresenta resistência cruzada a quatro grupos químicos de inibidores da enzima ALS. Os resultados de dose-resposta obtidos em planta e em enzima sugerem que a ALS no biótipo R apresenta mutação que a torna insensível aos herbicidas inibidores da mesma. Na seqüência deste trabalho, aprofundaram-se os estudos para elucidar as bases da resistência.

5.3 Base molecular e genética da resistência

Com base nos ensaios enzimáticos que sugerem a ALS mutada como mecanismo da resistência aos inibidores da enzima em *B. subalternans*, o objetivo desta etapa da pesquisa foi identificar a base molecular da resistência. Porém, a natureza poliplóide de *B. subalternans* tornou complexo o seqüenciamento do gene, pois os alelos da ALS apresentam elevada similaridade, dificultando seu isolamento.

O sequenciamento do gene da ALS em *B. subalternans* demonstrou ocorrência de, pelo menos, três alelos nesta espécie (Figuras 13 e 15). A

presença de mais de um alelo para o gene da ALS era esperada, uma vez que esta espécie é tetraplóide (Grombone-Guaratini *et al.*, 2006). Inicialmente, optou-se pelo sequenciamento direto do gene da ALS, a partir do uso de *primers* degenerados disponíveis na literatura (Prado *et al.*, 2004) e, posteriormente, o desenvolvimento de *primers* específicos. Porém, dado o insucesso em separar os alelos da ALS devido a sua elevada similaridade, optou-se pela clonagem, técnica amplamente utilizada pela área de biologia molecular.

A técnica de *Southern Blot*, apesar da foto não ser totalmente nítida, confirmou a ocorrência de múltiplos alelos em *B. subalternans*, observada após a clonagem (Figura 19). Diferentes alelos para o gene da ALS têm sido observados, de acordo com o nível de ploidia das espécies (Rutledge *et al.*, 1991, Ouellet *et al.*, 1992). A espécie diplóide *A. thaliana* tem apenas uma única cópia constitutiva do gene da ALS (Mazur *et al.*, 1987), assim como a também diplóide *Papaver rhoeas* (Scarabel *et al.*, 2004). *B. pilosa*, uma espécie hexaplóide (Grombone-Guaratini *et al.*, 2006), apresenta pelo menos dois alelos para o gene da ALS de acordo com acessos depositados no GenBank (acessos AJ632115, AJ632117, AJ514934, AJ514936). *Brassica napus*, uma espécie alotetraplóide, possui um complexo multigene com cinco alelos para a ALS (Rutledge *et al.*, 1991, Ouellet *et al.*, 1992).

Com base na análise dos domínios C, A, D, B e E dos alelos da ALS seqüenciados em *B. subalternans*, foi possível definir a base molecular da resistência aos inibidores da enzima. A mutação de triptofano (Trp) para leucina (Leu) na posição 574 do domínio B, identificada no alelo 2 (Figura 17) é a responsável pela resistência. A mesma mutação já foi relatada antes em

diferentes espécies daninhas (Bernasconi *et al.*, 1995; Hattori *et al.*, 1995; Foes *et al.*, 1998; Woodworth *et al.*, 1996; Patzoldt *et al.*, 2001; Patzoldt & Tranel 2002).

De todas as mutações até então conhecidas, a substituição de Trp por Leu na posição 574 é caracterizada por conferir elevados níveis de resistência aos quatro grupos químicos de inibidores de ALS (Patzoldt & Tranel, 2002; Christoffers *et al.*, 2006; Tardif *et al.*, 2006). O padrão de resistência apresentado por esta mutação está de acordo com o comportamento observado previamente nesta pesquisa em ensaios de curva de dose-resposta sobre planta e enzimáticos, onde fatores de resistência elevados foram determinados em biótipo de *B. subalternans*.

A análise cristalográfica da enzima ALS em *A. thaliana* demonstrou que a ligação de sulfoniluréias e imidazolinonas à enzima impede a passagem do substrato tiamina difosfato pelo canal de acesso ao local ativo da ALS (McCourt *et al.*, 2006). Os autores também relatam que mutações em alguns dos aminoácidos (resíduos), tais como M₁₂₄, P₁₉₇ e D₃₇₆, afetam diretamente a ligação dos herbicidas sulfoniluréias à enzima ALS, causando resistência.

O resíduo Trp₅₇₄ além de definir a forma do canal de acesso ao local ativo da enzima, também serve de âncora para as diferentes classes de inibidores ligarem-se à mesma. Deste modo, a substituição por leucina afeta a forma do local de ancoragem, resultando em perda das interações deste com os herbicidas e causando resistência (McCourt *et al.*, 2006). O resíduo Trp₅₇₄ é considerado um dos mais importantes para o sucesso da ligação de qualquer sulfoniluréia à ALS (Duggleby *et al.*, 2008). É comum a sobreposição de resíduos quando da ligação dos herbicidas dos diferentes grupos químicos dos

inibidores da ALS à enzima; por exemplo, sulfoniluréias e imidazolinonas têm pelo menos, 10 aminoácidos de ancoragem em comum (Duggleby *et al.*, 2008). Isto explica porque da ocorrência de resistência cruzada aos inibidores da ALS quando a mutação ocorre num destes aminoácidos.

Neste trabalho, foram observados poucos polimorfismos entre as seqüências dos biótipos S e R de cada alelo, quando estas foram comparadas (Figuras 13, 15 e 17). No entanto, as mutações encontradas e que não estão entre aquelas já descritas e, portanto, comprovadamente associadas à resistência aos inibidores da ALS, necessitam ainda de maior investigação. Substituições encontradas no biótipo R para o alelo 3, como fenilalanina (Phe) por leucina (Leu) na posição 111 e Phe por serina (Ser) na posição 149 (Figura 13), não foram até então relatadas pela literatura.

A substituição de metionina (Met) na posição 124 por isoleucina (Ile) em *A. thaliana*, aumentou em quatro vezes a resistência ao imazethapyr (Ott *et al.*, 1996). Ambos os biótipos de *B. subalternans*, S e R, apresentaram Leu ao invés de Met na posição 124 no alelo 3 da ALS. Resultado semelhante foi observado em plantas suscetíveis de *Ambrosia trifida* (Patzoldt & Tranel, 2002). Porém, neste caso, a alteração foi de Met por valina (Val), na posição 124. Isoleucina (em *A. thaliana*) e valina (em *A. trifida*) apresentam propriedades muito parecidas (ambos são aminoácidos hidrofóbicos e diferem apenas por um grupamento metil). Deste modo, a substituição por valina poderia causar também um leve aumento na resistência a imazethapyr em *A. trifida*. Entretanto, se ocorreu este incremento no nível de resistência, não foi possível detectar através dos ensaios de curva de dose-resposta realizados (Patzoldt & Tranel,

2002). O mesmo raciocínio talvez proceda para *B. subalternans*, uma vez que leucina também apresenta características bastante próximas a isoleucina.

Em geral, em todas as seqüências conhecidas do gene de ALS, as cinco regiões ou domínios são bastante conservados. Exceções conhecidas são as espécies carrapichão e *Ambrosia artemisiifolia* que possuem alanina ao invés de serina na posição 653 (Patzoldt & Tranel, 2002). O alelo 3 para a ALS em *B. subalternans* também se caracteriza pela presença de alanina na mesma.

Quando comparados os diferentes domínios conservados do gene, os alelos 1 e 2 em *B. subalternans* apresentaram alta similaridade, em média, acima de 95%. Resultado semelhante foi observado para a autotetraplóide *Nicotiana tabacum*, a qual apresenta dois alelos para a ALS com 95% de similaridade (Lee *et al.*, 1988). Em *Brassica napus*, os alelos 1 e 3 foram considerados homólogos por compartilharem 98% de homologia (Rutledge *et al.*, 1991). A ausência de uma terceira seqüência da ALS em *B. subalternans* para os domínios B e E, permite estimar que um dos alelos compartilhe a mesma seqüência gênica para estes domínios (Figura 17).

A elevada homologia entre os alelos 1 e 2 permite hipotetizar que eles tenham evoluído a partir de um gene comum para ALS, o qual sofreu duplicação. As seqüências dos alelos para ALS apresentam homologia apenas com um dos alelos seqüenciados em *B. pilosa* (acessos AJ632115 e AJ514936, GenBank, correspondentes aos domínios C, A, D e B, E, respectivamente). De acordo com Grombone-Guaratini *et al.* (2005), *B. subalternans* e *B. pilosa* poderiam ser consideradas uma única espécie se a taxonomia do grupo fosse baseada apenas em dados gerados a partir de análises de isoenzimas. É possível que estas espécies tenham evoluído a partir de um ancestral comum,

o qual sofreu hibridização com outra espécie do gênero *Bidens*, gerando *B. subalternans* e *B. pilosa*.

Amplificando a seqüência inteira do gene da ALS, foi possível identificar um dos alelos (Figura 18). As porções denominadas alelo 1 nos domínios C, A, D, (Figuras 12 e 13), B e E (Figuras 16 e 17) e na região intermediária (Figuras 14 e 15), constituem a seqüência parcial de um alelo para ALS em *B. subalternans*, denominada ALS1. Dificuldades na otimização da amplificação não permitiram identificar as seqüências parciais dos demais alelos.

A distância da ALS3 para as demais seqüenciadas, dada a conservação do gene para a ALS, nos permite especular que ALS3 não seja expressa como enzima funcional. Portanto, uma vez que a seqüência completa de ALS1 foi obtida (Figura 18) e não foi identificada mutação para a resistência neste alelo, a alteração de Trp por Leu na posição 574 deve ocorrer no domínio B de ALS2.

Genes duplicados por poliploidia em uma espécie podem reter sua função original, alterá-la ou alterar a regulação da proteína, ou ainda, serem silenciados em pelo menos um dos alelos (Adams & Wendel, 2005). A presença de múltiplas cópias da ALS não parece ser necessária para o crescimento e desenvolvimento das plantas, assim como ocorre em *A. thaliana* e *Papaver rhoeas*, ambas com apenas uma cópia da enzima (Mazur *et al.*, 1987; Scarabel *et al.*, 2004). Em *Brassica napus*, estudos demonstraram que, dos cinco alelos da ALS encontrados, apenas os alelos 1 e 3 são essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta (Rutledge *et al.*, 1991). Dois alelos para ALS são expressos em *Nicotiana tabacum*, sendo que, um deles ocorre em maiores níveis de expressão que o outro (Keeler *et al.*, 1993). Em *B. subalternans*, pode ser que os alelos 1 e 2 tenham papéis fundamentais na

atividade da enzima, permitindo que o alelo 3 ficasse livre para mutar, fato corroborado pela identificação de mutações entre os biótipos R e S apenas neste alelo. É possível que espécies como *Nicotiana* e *B. subalternans*, caso essa última expresse todos os alelos existentes, apenas mantenham as múltiplas cópias da ALS por razões de regulação órgão-específica e desenvolvimento.

Estudos avaliando a transcrição e expressão dos diferentes alelos da ALS em *B. subalternans* poderiam esclarecer a contribuição de cada um deles nas atividades da planta e associá-la com a resistência aos herbicidas. Grombone-Guaratini *et al.*, (2005) analisando padrões de isoenzimas em *B. subalternans* não identificaram duplicação das mesmas indicada por locus gênicos duplicados e, sim, um aparente perfil diplóide de aloenzimas. Segundo os autores, o perfil observado poderia ser explicado pelo silenciamento gênico. De fato, com a evolução, as espécies poliplóides tendem a reduzir o número de genes expressos a um nível similar ou semelhante ao ancestral diplóide (Haufler, 1987; Anderson & Warwick, 1999).

Os resultados referentes ao estudo da base molecular da resistência aos inibidores da ALS em *B. subalternans* são consistentes com a hipótese desta pesquisa de que, local de ação alterado, causado por mutação no gene da enzima ALS, é o responsável pela perda de afinidade de moléculas herbicidas com a enzima, resultando no fenômeno evolutivo da resistência. A mutação responsável pela resistência em *B. subalternans* compromete a eficácia no controle da espécie pelos herbicidas inibidores da ALS sulfoniluréias, imidazolinonas, pirimidil-benzoatos e sulfonanilidas.

Com relação ao estudo de herança genética, o fato de parte das sementes da geração F1 germinarem e produzirem F2 e, inexplicavelmente, não se desenvolverem além de duas folhas verdadeiras, é intrigante. Apesar de oriundos de locais diferentes, os biótipos R e S pertencem à mesma espécie, fato comprovado tanto por análise citogenética (Figura 33) como por identificação taxonômica realizada com auxílio de taxonomista, descartando a hipótese de confusão com a espécie *B. pilosa*.

Na literatura, Gillet (1975) relata que cruzamentos entre espécies de *Bidens* das ilhas Hawaii com *Bidens ahnnei* das ilhas Marquesas, ambas ilhas da Polinésia e todas poliplóides com $2n = 72$, produziram sementes F1 as quais germinaram e produziram plantas com flores vigorosas; porém, todas elas foram estéreis. Já, cruzamentos interespecíficos com espécies somente das ilhas Hawaii, produziram sementes F1 e F2 férteis. A explicação estaria na existência de barreira genética. Uma população geograficamente definida que é geneticamente distinguível de outras populações locais, mas é capaz de trocar genes algumas vezes com outras populações locais, é chamada de raça geográfica (Griffiths *et al.*, 2002). Em geral, há alguma diferença na frequência de vários genes em populações geográficas diferentes de uma espécie, de modo que a caracterização de uma determinada população como uma raça distinta é arbitrária.

Não é possível determinar se a separação geográfica (biótipos R e S originários de estados distantes) e o histórico de cada biótipo (R, originário de área agrícola e S, de área urbana) avaliados neste trabalho, possam resultar em uma barreira genética ou em um mecanismo de isolamento biológico. Há dois tipos de isolamento, o pré-zigótico, onde não há formação de zigotos e, o

pós-zigótico, onde pode ocorrer, por exemplo, inviabilidade dos híbridos (Griffiths *et al.*, 2002). Neste caso, os híbridos formados não se desenvolvem ou, têm uma adaptabilidade menor que os indivíduos da espécie parental. Nesta pesquisa, foi observado que parte dos híbridos não se desenvolveu. Todavia, a parte que gerou sementes F2, não pôde ser avaliada. Caso um mecanismo de isolamento realmente estivesse atuando neste caso, seria possível que a geração F2 fosse estéril ou, ainda, menos adaptada que os pais R e S.

De maneira geral, a resistência aos inibidores da ALS têm sido controlada por um gene nuclear dominante em leiteira (Vargas *et al.*, 2001), ou parcialmente dominante em *Solanum nigrum* (Volenberg & Stoltenberg, 2002) e em *Monochoria korsakowii* (Wang *et al.*, 2003). Isto implica que a resistência pode ser dispersa tanto por sementes como via pólen. Deste modo, a hipótese de que gene maior ou poucos genes de grande efeito, com herança nuclear controlam a resistência aos herbicidas inibidores de ALS em biótipo de *B. subalternans*, não pôde ser testada, sendo necessários maiores estudos sobre conseqüências da hibridização nesta espécie utilizando biótipos originários de mesmo local.

Embora *B. subalternans* seja preferencialmente autógama, estudos demonstram que insetos himenópteros e lepidópteros são freqüentes polinizadores do gênero *Bidens* (Grombone-Guaratini *et al.*, 2004). Assim, eles são potentes facilitadores da dispersão da resistência. Uma vez que a dispersão da resistência aos inibidores da ALS em *B. subalternans* pode ocorrer via sementes e também fluxo gênico via polinização por insetos, o

manejo da resistência deve focar no controle desta infestante evitando o florescimento e a conseqüente produção de sementes pelas plantas resistentes.

5.4 Comparação de valores adaptativos

Os ensaios conduzidos para comparação dos valores adaptativos entre os biótipos R e S de *B. subalternans*, na condição de ausência do agente de seleção, visaram demonstrar se a mutação para a resistência gera efeito pleiotrópico no biótipo R. Não foi possível utilizar linhagens isogênicas por problemas já discutidos, e deste modo, biótipos R e S de locais diferentes foram comparados entre si. Desta maneira, nos é permitido apenas inferir indiretamente sobre possíveis conseqüências da mutação para a resistência sobre o biótipo R.

O uso de biótipos de locais diferentes têm sido utilizado em estudos de comparação e valores adaptativos (Vidal & Trezzi, 1999; López-Ovejero *et al.*, 2007). Entretanto, a ressalva de que não é possível afirmar se há ou não conseqüências da resistência sobre o biótipo R deve ser feita, uma vez que o background genético é diferente e pode mascarar os resultados.

Quando comparados os crescimentos relativos dos biótipos, em ambos os ensaios conduzidos, observa-se que o S floresce antecipadamente e apresenta, em média, estatura mais elevada que o R aos 46 DAE (Figuras 20 e 21). Entretanto, a estatura superior do S é diluída no acúmulo de massa seca da parte aérea (Figuras 22 e 23), de raízes (Figuras 24 e 25) e massa seca total (Figuras 26 e 27), não havendo diferenças quando comparados ao R. Resultados semelhantes foram observados por López-Ovejero *et al.*, (2007) comparando biótipos de capim-colchão S e R aos inibidores da ACCase. A

ausência de diferenças no acúmulo de massa seca total sugere equivalência de crescimento entre os biótipos. Ausência de diferença em relação à massa seca da parte aérea entre biótipos R e S aos inibidores da ALS de *Kochia scoparia*, também foi observada por Christoffoleti *et al.*, (1997).

A relação MSPA e MSR indica comportamento similar entre os biótipos (Figura 28) no Ensaio 1. A resposta observada para a mesma relação no Ensaio 2 foi inversa àquela esperada e observada para o Ensaio 1 e a menor magnitude de valores para as demais variáveis no segundo ensaio, podem ser justificados, considerando-se alguns aspectos. Primeiramente, os Ensaios 1 e 2 foram conduzidos em locais diferentes. No primeiro ensaio as plantas cresceram sob intensa radiação solar e temperaturas elevadas, em pleno verão, consistentes com as condições de campo às quais *B. subalternans*, em geral, cresce e desenvolve-se (Kissman & Groth, 1999). No segundo ensaio, os biótipos cresceram em casa de vegetação, com temperaturas médias inferiores às do Ensaio 1 em função da época de condução do experimento (verão-outono). Outro aspecto está no substrato utilizado no Ensaio 2, o qual apresentou pH baixo, com presença de alumínio tóxico, identificados em análise realizada após os sintomas observados nas plantas. Com certeza, estas implicações afetaram o comportamento dos biótipos no segundo ensaio, comprovado pelos resultados observados para a relação MSPA e MSR, quando ambos investiram em crescimento da parte aérea em detrimento das raízes que apresentavam limitação para expandirem-se, devido às condições do substrato utilizado. De acordo com Aguiar (1998), a toxidez por alumínio afeta diretamente as raízes das plantas. Como consequência da sua presença, há redução da divisão celular e impedimento da produção de reguladores de

crescimento nas partes novas das raízes, impossibilitando a divisão celular e a absorção de cálcio.

De qualquer modo, ambos os ensaios demonstram não haver diferenças quanto ao crescimento relativo dos biótipos S e R de *B. subalternans*. O início do florescimento duas semanas antes do biótipo S quando comparado ao R, poderia ter implicações na disseminação da resistência uma vez que evitaria o fluxo gênico entre os biótipos, causado pela polinização por insetos. Todavia, é possível que este comportamento seja conseqüência da adaptabilidade de cada biótipo ao seu local de origem, o S à região sul do Brasil e o R à região centro-oeste e, portanto, não é possível afirmar que a mutação responsável pela resistência esteja atrasando o florescimento pelo biótipo R. Além disto, *B. subalternans* possui a capacidade de florescer continuamente durante o seu desenvolvimento até o final do ciclo de vida, o que permitiria a coexistência de flores em plantas R e S durante a estação de crescimento e, conseqüentemente, fluxo de pólen entre ambos biótipos.

A adaptabilidade ecológica de um biótipo refere-se ao seu sucesso evolutivo, combinando características de crescimento, sobrevivência e reprodução (Holt & Radosevich, 1983). Portanto, a análise de valores adaptativos inclui obrigatoriamente análise do comportamento de sementes, investigando a viabilidade e germinação das mesmas. Os resultados obtidos nos ensaios de germinação indicam que o biótipo S germina primeiramente que o R (Figura 29), confirmado pelas maiores taxas de germinação, menor tempo médio e maior coeficiente de velocidade de germinação calculados (Tabela 10). Os resultados também indicam que o biótipo R produz sementes viáveis e que,

embora mais lentamente que o S, apresenta capacidade de germinação acumulada de sementes acima de 90% em quatorze dias (Figura 29).

Situação inversa foi observada quando os biótipos germinaram na temperatura de 15,1°C (Figura 30). Nesta condição de estresse, o biótipo R, inicialmente, demonstrou maior germinação acumulada que o S. Resultado semelhante é encontrado na literatura (Dyer *et al.*, 1993; Eberlein *et al.*, 1997; Eberlein *et al.*, 1999). No presente estudo, o biótipo R apresentou 10% mais leucina e isoleucina nas sementes do que o S. Segundo trabalhos da literatura, maiores níveis dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina nas sementes dariam vantagens na germinação em condições de baixas temperaturas ao biótipo resistente (Dyer *et al.*, 1993; Eberlein *et al.*, 1997). De acordo com Eberlein *et al.*, (1997), a atividade da enzima ALS no R foi 57% menor que no S e, também no R, a ALS foi menos sensível à regulação pelos aminoácidos valina, leucina e isoleucina. A reduzida sensibilidade à inibição da enzima foi correlacionada às maiores concentrações daqueles aminoácidos nas sementes do R.

Elevados níveis de isoleucina e possivelmente valina, ambos requeridos para a síntese de DNA, podem induzir a maior divisão celular e crescimento mais acelerado quando na condição de baixa temperatura pelo biótipo R (Eberlein *et al.*, 1999). Novamente é importante ressaltar que, neste trabalho, ambos os biótipos apresentam diferentes *backgrounds* genéticos. Portanto, tanto na condição de baixa temperatura como em condições normais de germinação, seriam necessários estudos conduzidos com linhagens isogênicas obtidas a partir de plantas R e S para esclarecimento de possíveis efeitos pleiotrópicos sobre o R.

A vantagem observada para o biótipo R se extrapolada para condições de campo, poderia garantir sucesso do mesmo em se estabelecer precocemente e obter vantagem na ocupação do nicho ecológico quando comparado ao S, dada a reduzida dormência sob baixa temperatura. Todavia, se os resultados observados de maior velocidade de germinação para o S em condições ideais for comprovada, ele se estabelecerá primeiro na área e ganhará vantagem sobre o R num cenário sem a aplicação do herbicida. Porém, mesmo quando da aplicação deste, o R germinará tardiamente, favorecendo o incremento de alelos na população de plantas.

De maneira geral, não foram observadas diferenças de competitividade entre os biótipos. Observa-se que as produções relativas para os biótipos R e S não diferem estatisticamente, à exceção de quando os biótipos ocorrem em proporções similares (Figura 31). A habilidade de cada biótipo interferir um com o outro é equivalente. De fato, cada biótipo contribui para a biomassa total em proporção equivalente a sua presença na mistura, o que está em concordância com o crescimento observado para estes biótipos (Figuras 26 e 27).

Caso os valores de PRT fossem inferiores a 1, correspondendo a uma linha côncava, ocorreria prejuízo mútuo ao crescimento das espécies associadas. Contrariamente, caso os valores fossem superiores a 1, representados por uma linha convexa, indicariam que a competição é evitada, pelo fato de o suprimento de recursos superar a demanda ou porque as espécies possuem diferentes demandas pelos recursos do ambiente. Mas, os resultados do presente trabalho indicam que não houve diferença para o PRT, sugerindo que os biótipos competiram em igual magnitude pelo(s) mesmo(s) recurso(s) do meio (Tabela 12).

A interpretação conjunta de CR, K e A indica com maior segurança a competitividade dos biótipos envolvidos (Hoffman & Buhler, 2002). A ausência de significância para a competitividade relativa (CR) indica que não houve crescimento superior de um biótipo sobre o outro (Tabela 13). Entretanto, o valor do coeficiente de agrupamento relativo (K) superior para o biótipo R, supõe domínio dele sobre o biótipo S (Tabela 13). Este fato explica a redução da massa seca da parte aérea pelo S quando os biótipos ocorrem em proporção similar. Mas, de acordo com o índice de competitividade (A), nenhum biótipo demonstrou agressividade superior (Tabela 13). Em valor absoluto, a PRT é inferior a 1 quando os biótipos ocorrem na proporção 50:50 (Tabela 12), indicando haver prejuízo mútuo de ambos os biótipos. Este resultado, associado à ausência de significância para o CR e A, demonstra não ser possível afirmar que o biótipo R é mais competitivo que o S.

Estudos abordando valores adaptativos deveriam comparar biótipos de diferentes locais visando representar a variabilidade adaptativa dentro dos biótipos R e S (Gill *et al.*, 1996; Vidal & Trezzi, 1999). Embora apenas dois biótipos de *B. subalternans*, um S e um R, tenham sido avaliados neste estudo, eles demonstram possuir a mesma competitividade. Assim, os resultados observados confirmam a hipótese de que não existe penalidade quanto ao valor adaptativo entre biótipos de *B. subalternans* S e R aos herbicidas inibidores de ALS. Portanto, ambos biótipos apresentam similaridades quanto ao crescimento e capacidade reprodutiva.

5.5 Considerações finais

Cada população de plantas possui variabilidade genética, a qual é consequência de forças evolutivas que atuam alterando a estrutura da população (McDonald & Linde, 2002). Para que a resistência evoluísse na população de *B. subalternans*, o alelo para a resistência aos inibidores da ALS estava presente antes mesmo que a seleção começasse a atuar. Uma vez imposta pressão de seleção pela contínua aplicação dos herbicidas, o alelo foi selecionado, disseminando-se na população. Embora seja comum a presença de insetos polinizadores em populações de *B. subalternans*, Hernandez (2004) constatou elevada variabilidade genética entre acessos resistentes de *Bidens* spp. coletados em diversas localidades, evidenciando que a seleção para a resistência ocorreu de forma independente nos diversos locais amostrados.

A mutação é a principal fonte de variabilidade genética para uma população e ocorre a taxas variadas e ao acaso. Mutações espontâneas nos organismos variam de 10^{-4} a 10^{-6} gametas por locus por geração (Hartl & Clark, 1997). Em geral, mutações da ordem de 10^{-5} alelos são observadas para inibidores da ALS. A elevada frequência de mutação aliada à intensa pressão de seleção imposta pelos herbicidas amplamente utilizados permite que a resistência aos inibidores da ALS evolua e manifeste-se em uma área em muito pouco tempo.

Além da mutação, o sistema reprodutivo da espécie e a forma de disseminação (via sementes e fluxo de pólen) afetam a evolução da resistência numa população de plantas. *B. subalternans* é preferencialmente autógama e pelos resultados observados, possivelmente alotetraplóide. Portanto, a disseminação da resistência ocorre de forma mais lenta se comparada a

espécies alógamas, mas também é possível que ocorra fluxo gênico devido à ocorrência de insetos polinizadores (Grombone-Guaratini *et al.*, 2004). Aliado a isso, as sementes de *B. subalternans* são facilmente disseminadas pelo homem e animais, além de também serem dispersas através do empréstimo de maquinário entre agricultores.

Populações de plantas daninhas adaptam-se em função de práticas adotadas para seu manejo. Fatores como pressão de seleção imposta, variabilidade genética presente na população, características de plantas e fatores ambientais afetam este processo evolutivo. A evolução da resistência aos herbicidas representa um enorme desafio aos agricultores atualmente. Ao definir estratégias de manejo de plantas resistentes como *B. subalternans*, um sistema integrado deve ser estabelecido. Murphy & Lemerle, (2006) abordam o potencial evolutivo que as plantas daninhas possuem diante das diferentes práticas agrônômicas utilizadas, em especial com a adoção do sistema plantio direto. Caso o único efeito pleiotrópico encontrado no biótipo R, germinação precoce em temperaturas frias, se confirme em outros biótipos R aos inibidores de ALS, então ele poderia ser utilizado em estratégias de manejo da resistência. Por exemplo, a postergação da data de semeadura das culturas de verão permitiria eliminar as infestantes que emergirem no período anterior à semeadura com diversas opções de herbicidas de mecanismos de ação alternativos. Ademais, possibilitaria a utilização de outros métodos de controle como o físico ou mecânico.

O biótipo R de *B. subalternans* investigado nesta pesquisa, não pode mais ser controlado com herbicidas inibidores da ALS. Na busca de alternativas para a resistência, herbicidas de diferentes mecanismos de ação têm sido

investigados. Para o controle de *B. subalternans* resistente aos inibidores da ALS, outros compostos têm sido utilizados, incluindo-se inibidores da protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) como lactofen, fomesafen e acifluorfen; inibidores de fotossíntese como metribuzin e bentazon; e inibidores da síntese de carotenóides como clomazone (Monquero *et al.*, 2001; Nicolai *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2006).

Vale ressaltar que apenas mudar de mecanismo de ação de herbicidas não leva à solução do problema. O exemplo de *Euphorbia heterophylla* com resistência múltipla aos inibidores da ALS e de PROTOX no estado do Paraná (Trezzi *et al.*, 2005) e com resistência múltipla aos inibidores de ALS e de EPSPS no estado do Rio Grande do Sul (Vidal *et al.*, 2007), ilustra as conseqüências desastrosas da simples troca do herbicida utilizado na área.

Novas tecnologias têm sido agregadas ao sistema agrícola nos últimos anos, como o uso de cultivos geneticamente modificados e resistentes a outros herbicidas. O controle de *B. subalternans* resistente aos inibidores da ALS em lavouras de soja seria beneficiado com a adoção da soja transgênica resistente ao glyphosate. Porém, a opção por controlar espécies infestantes com apenas um herbicida continuamente por diversos anos, fatalmente selecionaria espécies resistentes ao produto alternativo. Este fato foi observado após repetidos anos de cultivo de soja transgênica no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, selecionando biótipos de *E. heterophylla* com diferentes graus de resistência ao herbicida glyphosate (Vidal *et al.*, 2007; Marochi *et al.*, 2008).

Para evitar a seleção de biótipos resistentes ao glyphosate, uma opção alternativa aos agricultores da região de Jataí, Goiás, seria a rotação com a cultura do algodão geneticamente modificado resistente ao amônio-glufosinate.

Esta tecnologia encontra-se em fase de liberação no Brasil, tendo sido recentemente liberada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e, atualmente, está em análise pelo Ministério da Agricultura (Ministério da Ciência e Tecnologia, 2008). A alternância de herbicidas na área, permitiria atrasar a evolução da resistência (Powles & Shaner, 2001).

Outras oportunidades na utilização do método químico poderiam ser exploradas. Por exemplo, as associações de herbicidas reduzem a pressão de seleção imposta por um único mecanismo de ação, mas requer amplo conhecimento de sinergismo e antagonismo entre os produtos utilizados. Assim, o sinergismo nas associações entre clomazone e metribuzin, inibidores da síntese de carotenóides e do FS2, respectivamente, demonstrou potencial no controle de *B. subalternans* (Kruse *et al.*, 2006).

Embora o método químico seja o mais utilizado para o controle de plantas daninhas, sistemas de cultivo com práticas diversificadas poderiam resultar em menor uso de herbicidas e redução na pressão de seleção para a resistência. Mesmo nos cenários mais drásticos, com elevadas infestações de plantas daninhas resistentes aos herbicidas, poderiam ser mais bem manejadas caso os agricultores modificassem seus sistemas de cultivo (Beckie, 2006). Por exemplo, a exploração do potencial alelopático de diferentes espécies juntamente ao uso de cobertura morta, são estratégias que têm sido usadas com sucesso no sistema de semeadura direta. A manutenção de elevada quantidade de resíduos culturais na superfície do solo permite a redução da infestação de *Bidens* spp. (Trezzi, 2002). A utilização do método cultural através da seleção de cultivares com elevada capacidade competitiva,

reduziria a dependência dos herbicidas e seria uma forma complementar de manejo das infestantes (Lamego, 2004).

De todas as forças evolutivas que atuam sobre uma população de plantas, a seleção é a única na qual se pode interferir visando estratégias de manejo para resistência. Na natureza, há três tipos de seleção atuando: a direcional, a estabilizadora e a disruptiva. A seleção direcional empurra a população para a homozigose, rejeitando a maioria das novas mutações, mas ocasionalmente (se a mutação for vantajosa), espalha um novo alelo pela população a fim de criar um novo estado homozigoto (Griffiths *et al.*, 2002).

A utilização de herbicidas como principal forma de controle de plantas daninhas favorece a seleção direcional. É preciso, portanto, interromper o ciclo das plantas daninhas, conduzindo a uma seleção disruptiva, que irá favorecer os extremos, trazendo variabilidade para a população e atuando de maneira inversa à seleção direcional. Se a população de plantas daninhas no banco de sementes do solo for exposta ano a ano, ou safra a safra a diferentes formas de controle, ou seja, a um manejo integrado, a evolução da resistência poderá ser atrasada, uma vez que diferentes alelos para a resistência serão selecionados em tempos diferentes, reduzindo a taxa de aumento das suas frequências. Tática semelhante é sugerida por McDonald & Linde (2002) para a resistência a doenças em plantas cultivadas, propondo o uso de cultivares com diferentes genes para resistência ao ataque de patógenos. Desta forma, conduz-se à seleção disruptiva, interrompendo o ciclo de seleção do patógeno.

Nesta tese, demonstrou-se por contagem do número de cromossomos que os dois biótipos de *Bidens* avaliados pertenciam à espécie *subalternans*. Através de avaliação em planta e da enzima, demonstrou-se que um biótipo

era resistente e o outro suscetível aos herbicidas inibidores da ALS. Pela primeira vez na história da ciência brasileira obteve-se a mutação para resistência aos herbicidas em uma espécie daninha poliplóide, constatando-se que a resistência se deve à mutação de Trp₅₇₄ para Leu₅₇₄. Não foram detectadas diferenças adaptativas entre os biótipos R e S, tanto em condições não competitivas quanto competitivas, excetuando-se a melhor germinabilidade do biótipo R quando em condições de baixa temperatura.

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa é possível propor avanços futuros no estudo da resistência aos inibidores da ALS em *B. subalternans*. Os dados fornecidos por esta pesquisa, com exceção da frequência inicial para a resistência, mas que pode ser estimada, são possíveis de aplicação em sistemas de modelagem para prevenção da resistência.

A confirmação da resistência observada a campo pode ser muitas vezes demorada, de acordo com a metodologia empregada para sua investigação (Vidal *et al.*, 2006). A técnica conhecida como PASA (*PCR amplification of specific alleles*) consiste na amplificação de fragmentos da ALS, utilizando um *primer* alelo-específico que precisamente pareia com a seqüência no biótipo R e não no S por possuir um terminal 3' diferencial (Corbett & Tardif, 2006), juntamente com outro *primer* comum à amplificação no R e no S. O PASA tem sido amplamente utilizado com sucesso em espécies daninhas, uma vez que consiste num método fácil, rápido e preciso para a confirmação da resistência quando mutação(s) na enzima está envolvida (Newton *et al.*, 1989; Wagner *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2005).

Esta é a primeira vez que se identificou mutação para resistência aos inibidores da ALS em *B. subalternans*. O PASA pode ser desenvolvido

buscando identificar nos biótipos suspeitos de resistência, a mesma mutação encontrada nesta pesquisa (Trp₅₇₄Leu), de maneira eficiente. Para implementação da técnica, o par de *primers* desenvolvido neste trabalho que amplifica com sucesso o fragmento correspondente aos domínios B, E (onde foi encontrada a mutação) é utilizado como controle, amplificando fragmento de tamanho conhecido tanto no alelo suscetível como no resistente. O *primer* alelo-específico desenvolvido, irá juntamente com um dos *primers* que amplifica em ambos os biótipos, produzir fragmento com tamanho menor contendo a mutação no R.

Além de implementar o PASA baseado na mutação identificada neste trabalho, é possível ir mais longe e sugerir adaptar a mesma técnica para identificar demais mutações, dentre aquelas conhecidas para a resistência na ALS. Através do desenvolvimento de *primers* alelo-específicos para cada uma das mutações conhecidas e, utilizados em conjunto com um dos *primers* comuns ao S e ao R, é possível desenvolver a técnica (Corbitt & Tardif, 2006). O grande desafio está no desenho do *primer* alelo-específico e no ajuste das condições para a reação de PCR, acertando a concentração ideal de componentes da mesma, bem como a temperatura correta para o pareamento dos *primers*.

Desenvolvido o PASA para confirmação de resistência aos inibidores da ALS em biótipos de *B. subalternans*, o mesmo poderia ser ferramenta de apoio na rápida identificação de casos observados nas áreas agrícolas. Sempre que plantas suspeitas sobrassem nas lavouras, ou seja, não fossem controladas após aplicação do herbicida, folhas deveriam ser coletadas, congeladas e enviadas imediatamente ao laboratório para investigação. Sem a necessidade

de seqüenciar o gene inteiro da ALS em busca da(s) mutação(s), o PASA verificaria diretamente os pontos possíveis de mutação para a resistência no gene da enzima. Este procedimento tornaria a investigação da resistência em *B. subalternans* mais rápida, barata, eficaz e capaz de ser realizada por qualquer laboratório com mínimas adequações para estudos de biologia molecular.

Outra sugestão para futuros estudos a serem desenvolvidos, está na investigação da expressão dos diferentes alelos para ALS ocorrentes no genoma de *B. subalternans*. Partindo do suposto que apenas uma única cópia da enzima expressa é suficiente para a manutenção das funções na planta, estariam os demais alelos sendo expressos? Ou os mesmos estariam silenciados? Com o uso de tecnologias como *Northern Blot* e PCR em tempo real (*real time PCR*) níveis de expressão a partir de RNA extraído de plantas suscetíveis de *B. subalternans* primeiramente, nos diriam se todos os alelos para a ALS constituem-se em cópias ativas na planta. Posteriormente, a comparação dos níveis de expressão dos alelos entre plantas S e R poderiam indicar implicações na resistência aos inibidores da ALS.

6 CONCLUSÕES

A resistência aos herbicidas inibidores da enzima ALS em *Bidens subalternans* é elevada e inviabiliza o controle desta infestante pelos inibidores da enzima, pertencentes aos grupos químicos sulfoniluréia, imidazolinona, triazol-pirimidina sulfonanilida e pirimidil-benzoato.

A base molecular da resistência aos inibidores da ALS em *B. subalternans* está na mutação de triptofano para leucina (Trp₅₇₄Leu), comprometendo a ligação dos herbicidas ao local de ação e causando elevados níveis de resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ALS.

O esclarecimento da base molecular da resistência aos inibidores da ALS em espécies daninhas poliplóides, como *B. subalternans*, é complexo e requer mais tempo investido na busca de mutação (s) que impede a ligação do herbicida ao seu local de ação.

Local de ação alterado como mecanismo de resistência aos inibidores da ALS, não causa penalidade no crescimento e desenvolvimento do biótipo resistente de *Bidens subalternans*, sendo necessários estudos com linhagens isogênicas para afirmação de que não há diferenças adaptativas quando os biótipos suscetível e resistente crescem em condições competitivas ou não.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, K. L.; WENDEL, J. F. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, n. 2, p. 135-141, 2005.

AGUIAR, A.P.A. **Manejo da fertilidade do solo sob pastagem, calagem e adubação**. Guaíba: Agropecuária, 1998. 120p.

ALCOCER-RUTHLING, M.; THILL, D. C.; SHAFII, B. Differential competitiveness of sulfonylurea resistant and susceptible prickly lettuce (*Lactuca serriola*). **Weed Technology**, Champaign, v. 6, n. 2, p. 303-309, 1992.

ALLARD, R.W. **Principles of plant breeding**. 3. ed. New York: J. Wiley, 1960. 485p.

ALMEIDA, F. S. **A alelopatia e as plantas**. Londrina: Fundação IAPAR, 1988. 60p. (IAPAR, Circular 53, 1988).

ANDERSON, J. K.; WARWICK, S. L. Chromosome number evolution in the tribe Brassicaceae (*Brassicaceae*): Evidence from isozyme number. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 215, n. 1-4, p. 255-285, 1999.

ANGUS, J.F.; CUNNINGHAM, R.B.; MONCUR, M.W.; MACKENZIE, D.H. Phasic development in field crops. I. Thermal response in the seedling phase. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 3, n. 4, p. 365-378, 1981.

ASHIGH, J.; RAJCAN, I.; TARDIF, F. J. Genetics of resistance to acetohydroxyacid synthase inhibitors in populations of eastern black nightshade (*Solanum ptychanthum*) from Ontario. **Weed Science**, Lawrence, v. 56, n. 2, p. 210-215, 2008.

BALLARD, R. *Bidens pilosa* complex (Asteraceae) in North and Central America. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 73, n. 10, p.1452-1465, 1986.

BARAK, Z.; CALVO, J.M.; SCHLOSE, J.V. Acetolactate synthase isozyme from *Escherichia coli*. In: **Branched-Chain Amino Acids: methods in enzymology**. San Diego: Academic Press, v.166, 1988, p. 455-458.

BECKIE, H. J. Herbicide-resistant weeds: management tactics and practices. **Weed Technology**, Lawrence, v. 20, n.3, p. 793-814, 2006.

BERNASCONI, P.; WOODWORTH, A. R.; ROSE, B. A.; SUBRAMANIAN, M. V. SIEHL, D. L. A naturally occurring point mutation confers broad range tolerance to herbicides that target acetolactate synthase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 270, n. 29, p. 17381-17385, 1995.

BETTS, K. J. ; EHLKE, N. J. ; WYSE, D. L. ; GRONWALD, J. W.; SOMERS, D. A. Mechanism of inheritance of diclofop resistance in italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). **Weed Science**, Champaign, v. 40, n. 2, p. 184-189, 1992.

BURGOS, N. R.; KUK, Y.; TALBERT, R. E. *Amarathus palmeri* resistance and differential tolerance of *Amaranthus palmeri* and *Amaranthus hybridus* to ALS-inhibitor herbicides. **Pest Management Science**, W Sussex, v. 57, n. 5, p. 449-457, 2001.

CHIPMAN, D.; BARAK, Z.; SCHLOSS, J. V. Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxyacids: acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases. **Biochimica Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, Amsterdam, v.1385, n. 2, p. 401-419, 1998.

CHRISTOFFERS, M. J. Genetic aspects of herbicide-resistant weed management. **Weed Technology**, Lawrence, v.13, n. 3, p. 647-652, 1999.

CHRISTOFFERS, M. J.; NANDULA, V. K.; HOWATT, K. A.; WEHKING, T. R. Target-site resistance to acetolactate synthase inhibitors in wild mustard (*Sinapsis arvensis*). **Weed Science**, Lawrence, v. 54, n. 2, p. 191-197, 2006.

CHRISTOFFOLETI, P. J. Bioensaio para determinação da resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da enzima ALS. **Bragantia**, Campinas, v. 60, n. 3, p. 261-265, 2000.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; FILHO, R. V.; SILVA, C. B. da. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, Brasília, v. 12, n. 1, p. 13-20, 1994.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; FOLONI, L. Dose response curves of resistant and susceptible *Bidens pilosa* to ALS inhibitor herbicides. In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE – WEEDS, 1., 1999, Brighton. **Proceedings of an international conference...**Brighton: International Conference, 1999. p.159-162.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. Principais aspectos da resistência de plantas daninhas ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, n. 3, p.507-515, 2003.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; WESTRA, P.; MOORE III, F. Growth analyses of sulfonyleurea-resistant and susceptible kochia (*Kochia scoparia*). **Weed Science**, Champaign, v. 45, n. 5, p. 691-695, 1997.

CHRISTOPHER, J. T.; POWLES, S. B.; LILJEGREN, D. R.; HOLTUM, J. A. Cross-resistance to herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*). II.

Chlorsulfuron resistance involves a wheat-like detoxification system. **Plant Physiology**, Rockville, v. 95, n. 4, p. 1036-1043, 1991.

CORBETT, C. A. L.; TARDIF, F. J. Detection of resistance to acetolactate synthase inhibitors in weeds with emphasis on DNA-based techniques: a review. **Pest Management Science**, W Sussex, v. 62, n. 7, p. 584-597, 2006.

COUSENS, R. Aspects of the design and interpretation of competition (interference) experiments. **Weed Technology**, Champaign, v. 5, n. 3, p. 664-673, 1991.

COUSENS, R.; O'NEILL, M. Density dependence of replacement series experiment. **Oikos**, Copenhagen, v. 66, n. 2, p. 347-352, 1993.

DE PRADO, R.; OSUNA, M. D.; VIDAL, R. A. Struggling with herbicide resistance: One step beyond. In: BIENNIAL CONFERENCE OF THE INDIAN SOCIETY OF WEED SCIENCE, 2007, Hisar. **Book of Papers...**Hisar: HAU, 2007. p. 68.

DIEBOLD, R. S.; McNAUGHTON, K. E.; LEE, E. A.; TARDIF, F. J. Multiple resistance to imazethapyr and atrazine in Powell amaranth (*Amaranthus powelli*). **Weed Science**, Lawrence, v. 51, n. 3, p. 312-318, 2003.

DINELLI, G.; MAROTII, I.; BONETTI, A.; CATIZONE, P.; URBANO, J. M.; BARNES, J. Physiological and molecular bases of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* biotypes from Spain. **Weed Research**, Oxford, v. 48, n. 3, p. 257-265, 2008.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Oklahoma, v. 19, p. 11-15, 1987.

DUGGLEBY, R. G.; McCOURT, J. A.; GUDDAT, L. W. Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 46, n. 3, p. 309-324, 2008.

DYER, W. E.; CHEE, P. W.; FAY, P. K. Rapid germination of sulfonylurea-resistant *Kochia scoparia* L. accessions is associated with elevated seed levels of branched-chain amino-acids. **Weed Science**, Champaign, v. 41, n. 1, p. 18-22, 1993.

EBERLEIN, C. V.; GUTTIERI, M. J.; BERGER, P. H.; FELLMAN, J. K.; MALLORY-SMITH, C. A.; THILL, D. C.; BAERG, R. J.; BELKNAP, W. R. Physiological consequences of mutation for ALS-inhibitor resistance. **Weed Science**, Lawrence, v. 47, n. 4, p. 383-392, 1999.

EBERLEIN, C. V.; GUTTIERI, M. J.; MALLORY-SMITH, C. A.; THILL, D. C.; BAERG, R. J. Altered acetolactate synthase activity in ALS-inhibitor resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). **Weed Science**, Lawrence, v. 45, n. 2, p. 212-217, 1997.

- EMBRAPA. Disponível em <http://www.embrapa.br>. Acesso em 05 mai. 2008.
- ENGBRECHT, J.; BRENT, R.; KADERBHAI, M. A. Minipreps of plasmid DNA. In: AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Eds.) **Current protocols in molecular biology**. 20. ed. CIDADE: John Wiley and Sons, 2003.
- EOYANG, L.; SILVERMAN, P. M. Purification and assays of acetolactate synthase from *Escherichia coli*. In: HARRIS, R. A.; SOKATCH, J. R. **Branched-Chain Amino Acids: methods in enzymology**. San Diego: Academic Press, v. 168, 1988. p. 435-445.
- FERREIRA, F. A.; SILVA, A. A.; REIS, M. R.; SANTOS, J. B.; OLIVEIRA, J. A.; VARGAS, L.; KHOURI, K. R.; GUIMARÃES, A. A. Distribuição de glyphosate e acúmulo de nutrientes em biótipos de azevém. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 1, p. 165-173, 2008.
- FOES, M. J.; LIU, L.; TRANEL P. J.; WAX, L. M.; STOLLER, E. W. A biotype of common waterhemp (*Amaranthus rudis*) resistant to triazine and ALS herbicides. **Weed Science**, Lawrence, v. 46, n. 5, p. 514-520, 1998.
- GAZZIERO, D. L. P.; BRIGHENTI, A. M.; MACIEL, C. D. G.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; ADEGAS, F. S.; VOLL, E. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da enzima ALS. **Planta Daninha**, Botucatu, v. 16, n. 2, p. 117-125, 1998.
- GAZZIERO, D. L. P.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; BRIGHENTI, A. M.; PRETE, C. E. C.; VOLL, E. Resistência da planta daninha capim-marmelada (*Brachiaria plantaginea*) aos herbicidas inibidores da enzima ACCase na cultura da soja. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 18, n. 1, p. 169-180, 2000.
- GELMINI, G. A. Resistência de *Bidens subalternans* aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase utilizados na cultura da soja. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 20, n. 2, p. 319-325, 2002.
- GERWICH, B. C.; MIRELES, L. C.; EILERS, R. J. Rapid diagnosis of ALS AHAS-resistant weeds. **Weed Technology**, Champaign, v. 7, n. 2, p. 519-524, 1993.
- GILL, G. S.; CONSENS, R. D.; ALLAN, M. R. Germination, growth, and development of herbicide resistant and susceptible populations of rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). **Weed Science**, Champaign, v. 44, n. 2, p. 252-256, 1996.
- GILLET, G. W. **The diversity and history of polynesian *Bidens* section *Campylotheca***. University of Hawaii: Honolulu, 1975. 32p.
- GILLET, G. W.; LIM, E. K. S. **An experimental study of the genus *Bidens* (Asteraceae) in the Hawaiian islands**. Berkeley: University of California, 1970. 63p.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H. ; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C. ; GELBART, W. M. **Introdução à genética**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2002. 794p.

GROMBONE-GUARATINI, M. T.; MANSANARES, M. E.; SEMIR, J.; SOLFERINI, V. N. Chromosomal studies of three species of *Bidens* L. (Asteraceae). **Caryologia**, Florence, v. 59, n. 1, p. 14-18, 2006.

GROMBONE-GUARATINI, M. T.; SEMIR, J.; SOLFERINI, V. N. Low allozymic variation in the *Bidens pilosa* L. complex (Asteraceae). **Biochemical Genetics**, New York, v. 43, n. 7/8, p.335-345, 2005.

GROMBONE-GUARATINI, M. T.; SOLFERINI, V. N.; SEMIR, J. Reproductive biology in species of *Bidens* L. (Asteraceae). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 2, p.185-189, 2004.

GRULA, J. W.; HUDSPETH, R. L.; HOBBS, S. L.; ANDERSON, D. M. Organization, inheritance and expression of acetohydroxyacid synthase genes in the cotton allotetraploid *Gossypium hirsutum*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 28, n. 5, p. 837-846, 1995.

HALL, L. M.; STROME, K. M.; HORSMAN, G. P. Resistance to acetolactate synthase inhibitors and quinclorac in a biotype of false clover (*Gallium spurium*). **Weed Science**, Lawrence, v. 46, n. 4, p. 390-396, 1998.

HANSON, B. D.; PARK, K. W. ; MALLORY-SMITH, C. A.; THILL, D. C. Resistance of *Camelina microcarpa* to acetolactate synthase inhibiting herbicides. **Weed Research**, Oxon, v. 44, n. 3, p. 187-194, 2004.

HART, J. J.; DITOMASO, J. M. Sequestration and oxygen radical detoxification as mechanisms of paraquat resistance. **Weed Science**, Champaign, v. 42, n. 2, p. 277-284, 1994.

HARTL, D. L.; CLARK, A.G. **Principles of population genetics**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1997, 3ed. 542p.

HAUFLER, C. H. Eletrophoresis is modifying our concepts of evolution in homosporous pteridophytes. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 74, n. 6, p. 953-966, 1987.

HATTORI, J.; BROWN, D.; MOURAD, G.; LABBE, H.; OUELLET, T.; SUNOHARA, G; RUTLEDGE, R.; KING, J.; MIKI, B. An acetohydroxy acid synthase mutant reveals a single site involved in multiple herbicide resistance. **Molecular & General Genetics**, New York, v. 246, n. 4, p. 419-425, 1995.

HEAP, I.; KNIGHT, R. The occurrence of herbicide cross-resistance in a population of annual ryegrass, *Lolium rigidum*, resistant to diclofop methyl. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood Victoria, v. 37, n. 2, p. 149-156, 1986.

HEAP, I. **International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.org/in.asp>>. Acesso em 01 abr. 2008.

HERNANDES, G. C. **Resistência de *Bidens* spp. aos herbicidas inibidores de acetolactato sintase: análise de populações com marcadores moleculares e estratégias para seu manejo**. Porto Alegre: UFRGS, 2004. 108 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

HILTON, H. W. Herbicide tolerant strains of weeds. **Hawaiian Sugar Planters Association Annual Reports**, Honolulu, v. 69, 1957.

HOFFMAN, M. L.; BUHLER, D. D. Utilizing Sorghum as functional model of crop-weed competition. I. Establishing a competitive hierarchy. **Weed Science**, Lawrence, v. 50, n. 4, p. 466-472, 2002.

HOLT, J.S.; RADOSEVICH, S.R. Differential growth of two common groundsel (*Senecio vulgaris*) biotypes. **Weed Science**, Champaign, v.31, n. 1, p.112-120, 1983.

HOLT, R. D.; HOCHBERG, M. E. When is biological control evolutionary stable (or is it?). **Ecology**, Washington, v. 78, n. 14, p. 1673-1683, 1997.

HRAC. **Herbicide Resistance Action Committee Glossary**. Disponível em: < <http://www.hracglobal.com/Glossary/tabid/369/Default.aspx> >. Acesso em 01 de mar. 2008.

JASIENIUK, M.; BRÛLÉ-BABEL, A. L.; MORRISON, I. N. The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. **Weed Science**, Champaign, v. 44, n. 1, p. 176-193, 1996.

KEELER, S. J.; SANDERS, P.; SMITH, J. K.; MAZUR, B. J. Regulation of tobacco acetolactate synthase gene expression. **Plant Physiology**, Rockville, v. 102, n. 3, p.1009-1018, 1993.

KEMP, M. S.; MOSS, S. R.; THOMAS, T. H. Herbicide resistance in *Alopecurus myosuroides*. In: GRENN, M. B.; LE BARON, H. M.; MOBERG, W. M. (Eds.) **Managing resistance to agrochemicals, from fundamental research to practical strategies**. Washington: American Chemical Society, 1990. p. 376-393.

KISSMAN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF, 1999. p. 227-234.

KOLKMAN, J. M.; SLABAUGH, M. B.; BRUNIARD, J. M.; BERRY, S.; BUSHMAN, B. S.; OLUNGU, C.; MAES, N.; ABRATTI, G.; ZAMBELLI, A.; MILLER, J. F.; LEON, A.; KNAPP, S. J. Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonyleurea herbicides in sunflower. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 109, n. 6, p. 1147-1159, 2004.

KREUZ, K.; TOMMASINI, R.; MARTINOIA, E. Old enzymes for a new job. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, n. 2, p. 349-353, 1996.

KRUSE, N. D.; VIDAL, R. A.; DALMAZ, C.; TREZZI, M. M.; SIQUEIRA, I. Estresse oxidativo em girassol (*Helianthus annuus*) indica sinergismo para a mistura dos herbicidas metribuzin e clomazone. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 2, p. 379-390, 2006.

KUK, Y. I.; BURGOS, N. R. Cross-resistance profile of mesosulfuron-methyl – resistant Italian ryegrass in the Southern United States. **Pest Management Science**, W Sussex, v. 63, n. 4, p. 349-357, 2007.

KUK, Y. I.; JUNG, H. I. ; KWON, O. D. ; LEE, D. J. ; BURGOS, N. R. ; GUH, J. O. Rapid diagnosis of resistance to sulfonylurea herbicides in monochoria (*Monochoria vaginalis*). **Weed Science**, Lawrence, v. 51, n. 3, p. 305-311, 2003.

LAMEGO, F. P. **Tolerância à interferência e habilidade de supressão de plantas competidoras por genótipos de soja**. Porto Alegre: UFRGS, 2004. 143 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

LAMEGO, F. P.; FLECK, N. G.; BIANCHI, M. A.; VIDAL, R. A. Tolerância à interferência de plantas competidoras e habilidade de supressão por cultivares de soja – I. Resposta de variáveis de crescimento. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, n. 3, p. 405-414, 2005.

LEE, K. Y.; TOWNSEND, J.; TEPPERMAN, J.; BLACK, M.; CHUI, C-F.; MAZUR, B.; DUNSMUIR, P.; BEDBROOK, J. The molecular basis of sulfonylurea herbicide resistance in tobacco. **EMBO Journal**, Oxford, v. 7, n. 5, p.1241-1248, 1988.

LÓPEZ-OVEJERO, R. F.; CARVALHO, S. J.; NICOLAI, M.; ABREU, A. G.; GROMBONE-GUARATINI, M. T.; TOLEDO, R. E. B.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Resistance and differential and susceptibility of *Bidens pilosa* and *B. subalternans* biotypes to ALS-inhibiting herbicides. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 2, p. 139-145, 2006.

LÓPEZ-OVEJERO, R. F.; NOVO, M. C. S. S.; CARVALHO, S. J.; NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Crescimento e competitividade de biótipos de capim-colchão resistente e suscetível aos herbicidas inibidores da acetil coenzima A carboxilase. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 1, p. 1-8, 2007.

MAGENTA, M. A. G. **As subtribus Ambrosiinae, Galinsoginae e Coreopsidinae (Heliantheae – Asteraceae) no Estado de São Paulo**. São Paulo: USP, 1998. 140 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

MAIMONI-RODELLA, R. C. S.; RODELLA, R. Biologia floral de *Ipomoea acuminata* Roem et Scult. (Convolvulaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 15, p. 129-133, 1992.

MALLORY-SMITH, C. A.; THILL, D. C.; DIAL, M. J. Identification of sulfonylurea herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). **Weed Technology**, Champaign, v.4, n. 1, p. 163-168, 1990.

MARIANO, A. C.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome polymorphism and cytotype establishment in *Bidens pilosa* (Asteraceae). **Cytobios**, Cambridge, v. 97, n. 384-390, p. 45-60, 1999.

MAROCHI, A. I.; GALLI, A. J. B. ; TRENTIN, R. ; TOCHETTO, S. Estudo de doses de glifosato em pós-emergência da soja Roundup Ready, em áreas consideradas com problemas de controle de *Euphorbia heterophylla* no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 26., 2008, Ouro Preto. **Anais...Ouro Preto: SBPCPD**, 2008. 1 CD-ROM.

MAZUR, B. J.; CHUÍ, C. F.; SMITH, J. K. Isolation and characterization of plant genes coding for acetolactate synthase, the target enzyme for two classes of herbicides. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, n. 4, p. 1110-1117, 1987.

MAZUR, B. J.; FALCO, S. C. The development of herbicide resistant crops. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 40, p. 441-470, 1989.

McCOURT, J. A.; PANG, S. S. ; KING-SCOTT, J.; GUDDAT, L. W.; DUGGLEBY, R. G. Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n.3, p. 569-573, 2006.

McDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 349-379, 2002.

McNAUGHTON, K.E. et al. Mutations in ALS confer herbicide resistance in redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) and Powell amaranth (*Amaranthus powellii*). **Weed Science**, Lawrence, v.53, n.1, p.17-22, 2005.

MEROTTO Jr., A. **Genetic and ecological factors determining the distribution of ALS-inhibiting herbicide resistance in *Cyperus difformis* L. in California rice and its implication for management**. Davis: University of California, 2007. 121 f. Tese (Doutorado) - University of California, Davis, 2007. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA. Disponível em: <<http://agenciact.mct.gov.br/index.php/content/view/49026.html>>. Acesso em 29 ago. 2008.

MONDIN, C. A. **Levantamento da tribo Heliantheae Cass. (Asteraceae), sensu stricto, no Rio Grande do Sul, Brasil.** Porto Alegre: UFRGS, 2004. 353 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Biologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

MONQUERO, P. A. **Biologia, manejo e caracterização bioquímica e genética de biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS).** Piracicaba: Esalq, 1999. 94 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

MONQUERO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Manejo de populações de plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores de acetolactato sintase. **Planta Daninha**, Viçosa, v.19, n. 1, p. 67-73, 2001.

MONQUERO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; CARRER, H. Biology, management and biochemical/genetic characterization of weed biotypes resistant to acetolactate synthase inhibitor herbicides. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 3, p. 409-503, 2003.

MONQUERO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; OSUNA, M. D.; DE PRADO, R. A. Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 3, p. 445-451, 2004.

MURPHY, C. E.; LEMERLE, D. Continuous cropping systems and weed selection. **Euphytica**, Dordrecht, v. 148, n. 1-2, p. 61-73, 2006.

NEWTON, C. R.; GRAHAM, A.; HEPTINSTALL, L. E.; POWELL, S. J.; SUMMERS, C.; KALSHEKER, N. ET AL . Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 17, n. 7, p. 2503-2516, 1989.

NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; MOREIRA, M. S.; CARVALHO, S. J. P.; TOLEDO, R.; SCARPARI, L. Alternativas de manejo para as populações de picão-preto (*Bidens pilosa* e *Bidens subalternans*) resistentes aos herbicidas inibidores da ALS. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Passo Fundo, v. 3, p. 72-79, 2006.

OUELLET, T.; RUTLEDGE, R. G.; MIKI, B. L. Members of the acetohydroxyacid synthase multigene family of Brassica-napus have divergent patterns of expression. **Plant Journal**, Oxon, v. 2, n. 3, p. 321-330, 1992.

OTT, K.; KWAGH, J.; STOCKTON, G. W.; SIDOROV, V.; KAKEFUDA, G. Rational molecular design and genetic engineering of herbicide resistant crops by structure modeling and site-directed mutagenesis of acetohydroxyacid synthase. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 263, n. 2, p. 359-368, 1996.

PANG, S. S.; GUDDAT, L. W.; DUGGLEBY, R. G. Molecular basis of sulfonylurea herbicide inhibition of acetohydroxyacid synthase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n. 9, p. 7639-7644, 2003.

PARK, K. W.; MALLORY-SMITH, C. A. Physiological and molecular basis for ALS inhibitor resistance in *Bromus tectorum* biotypes. **Weed Research**, Oxford, v. 44, n. 2, p. 71-77, 2004.

PASSINI, T. **Competitividade e predição de perdas de rendimento da cultura de feijão quando em convivência com *Brachiaria plantaginea* (Link) Hitchc**. Piracicaba: Esalq, 2001. 130 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

PATZOLDT, W. L.; TRANEL, P. J. Molecular analysis of cloransulam resistance in a population of giant ragweed. **Weed Science**, Lawrence, v.50, n. 3, p. 299-305, 2002.

PATZOLDT, W. L.; TRANEL, P. J.; ALEXANDER, A. L.; SCHMITZER, P. R. A common ragweed population resistant to cloransulam-methyl. **Weed Science**, Lawrence, v. 49, n. 4, p. 485-490, 2001.

PINTO, J. J. O.; ZANATTA, J. F.; FONTANA, L. C.; NOLDIN, J. A.; GALON, L.; ROSENTHAL, M. D.; NEVES, R. Resistência de picão-preto encontrada em lavoura de soja na metade sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Passo Fundo, v. 2, p. 37-44, 2006.

PONCHIO, J. A. **Resistência de *Bidens pilosa* L. aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase**. Piracicaba: Esalq, 1997. 138 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

POWLES, S. B.; HOLTUM, J. **Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry**. New York: CRC Press, 1994. 353p.

POWLES, S. B.; PRESTON, C. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. **Weed Technology**, Lawrence, v. 20, n. 2, p. 282-289, 2006.

POWLES, S. B.; PRESTON, C. **Herbicide cross resistance and multiple resistance in plants**. Disponível em: <http://ipmwww.ncsu.edu/orgs/hrac/mono2.htm>. 1998. 26p.

POWLES, S. B.; SHANER, D. L. **Herbicide resistance and world grains**. Boca Raton: CRC Press, 2001. 308p.

PRADO, M.D.; DE PRADO, R.; FRANCO, A.R. Design and optimization of degenerated universal primers for the cloning of the plant acetolactate synthase conserved domains. **Weed Science**, Lawrence, v. 52, n. 4, p. 487-491, 2004.

- PRESTON, C.; POWLES, S.B. Evolution of herbicide resistance in weeds: initial frequency of target site-based resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. **Heredity**, London, v. 88, n. 1, p. 8-13, 2002.
- RADOSEVICH, S. R. Methods to study interactions among crops and weeds. **Weed Technology**, Champaign, v. 1, n. 1, p. 190-198, 1987.
- RADOSEVICH, S.; HOLT, J.; GHERSA, C. **Weed ecology**: implications for vegetation management. 2. ed. New York:Wiley, 1997. 589p.
- RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. de. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 1-11, 2006.
- RAY, T. B. Site of action of chlorsulfuron. **Plant Physiology**, Rockville, v. 75, n. 3, p. 827-831, 1984.
- RIGOLI, R. P.; AGOSTINETTO, D. ; SCHAEGLER, C. E. ; DAL MAGRO, T. ; TIRONI, S. Habilidade competitiva relativa do trigo (*Triticum aestivum*) em convivência com azevém (*Lolium multiflorum*) ou nabo (*Raphanus raphanistrum*). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 1, p. 93-100, 2008.
- RIZZARDI, M. A.; FLECK, N. G.; AGOSTINETTO, D. Nível de dano econômico como critério para controle de picão-preto em soja. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, n. 2, p. 273-282, 2003.
- RIZZARDI, M. A.; RIBAS, V. A.; FLECK, N. G.; AGOSTINETTO, D. Resistência de plantas aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Planta Daninha**, Viçosa, v.20, n. 1, p. 149-158, 2002.
- ROST, T. L.; GLADISH, D.; STEFFEN, J.; ROBBINS, J. Is there a relationship between branched amino acid pool size and cell cycle inhibition in roots treated with imidazolinone herbicides? **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 9, n. 4, p. 227-232, 1990.
- RUTLEDGE, R. G.; QUELLET, T.; HATTORI, J.; MIKI, B. L. Molecular characterization and genetic-origin of the brassica-napus acetohydroxyacid synthase multigene family. **Molecular & General Genetics**, New York, v. 229, n. 1, p. 31-40, 1991.
- RYAN, G. F. Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. **Weed Science**, Champaign, v. 18, n. 5, p. 614-616, 1970.
- SAARI, L. L.; COTTERMAN, J. C.; PRIMIANI, M. M. Mechanism of sulfonylurea herbicide resistance in the broadleaf weed, *Kochia scoparia*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, n. 1, p. 55-61, 1990.
- SALES, M. et al. Aminoacids substitutions in the acetolactate synthase gene of red rice (*Oryza sativa*) confer resistance to imazethapyr. **Weed Science**, Lawrence, v. 56, n. 4, p. 485-489, 2008.

SAS – Institute Statistical Analysis System. **User's guide**: version 6.4 ed. Cary: SAS Institute, 1989. 846p.

SCARABEL, L.; CARRARO, N.; SATTIN, M.; VAROTTO, S. Molecular basis and genetic characterisation of evolved resistance to ALS-inhibitors in *Papaver rhoeas*. **Plant Science**, Clare, v. 166, n. 3, p. 703-709, 2004.

SCHMITT, J. Pollinator foraging behavior and gene dispersal in *Senecio* (Compositae). **Evolution**, Lawrence, v. 34, n. 5, p. 934-943, 1980.

SEEFELDT, S. S.; JENSEN, J. E.; FUERST, E. P. Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. **Weed Technology**, Champaign, v. 9, n. 2, p. 218-227, 1995.

SHERFF, E. E. The genus *Bidens*. **Field Museum of Natural History Botanical Series**, Chicago, v. 16, p. 16-484, 1937.

SIMINSZKY, B.; COLEMAN, N. P. ; NAVEED, M. Denaturing high-performance liquid chromatography efficiently detects mutations of the acetolactate synthase gene. **Weed Science**, Lawrence, v. 53, n. 2, p. 146-152, 2005.

SINGH, B. K.; SHANER, D. L. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification glyphosate-resistant plants. **Weed Technology**, Champaign, v. 12, n. 3, p. 527-530, 1998.

SINGH, B.K.; STIDHAM, M.A.; SHANER, D.L. Assay of acetohydroxyacid synthase. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.171, n. 1, p.173-179, 1988.

SPRAGUE, C. L.; STOLLER, E. W.; WAX, L. M. Response of an acetolactate synthase (ALS)-resistant biotype of *Amaranthus rudis* to selected ALS-inhibiting and alternative herbicides. **Weed Research**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 93-101, 2007.

STANNARD, M.E.; FAY, P.K. Selection of alfafa seedlings for tolerance to chlorsulfuron. In: WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA MEETING, 61., 1987. **Proceedings....** 1987, p.45.

STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plant**. London: Addison-Wesley, 1971. 216p.

STREIBIG, J.C. Herbicide bioassay. **Weed Research**, Oxford, v. 28, n. 6, p.479-484, 1988.

SUN, M.; GANDERS, F. R. Outcrossing rates and allozyme variation in rayed and rayless morphs of *Bidens pilosa*. **Heredity**, Oxon, v. 64, n. 1, p.139-143, 1990.

SWITZER, C. M. The existence of 2,4-D resistant wild carrot. Procedures of Northeastern Weed Control Conference, Oshkosh, v. 9, p. 75-77, 1952.

TARDIF, F. J.; RAJCAN, I.; COSTEA, M. A mutation in the herbicide target site acetohydroxyacid synthase produces morphological and structural alterations and reduces fitness in *Amaranthus powellii*. **New Phytologist**, Oxon, v. 169, n. 2, p. 251-264, 2006.

THOMPSON, C. R.; THILL, D. C.; SHAFIL, B. Growth and competitiveness of sulfonylurea-resistant and susceptible kochia (*Kochia scoparia*). **Weed Science**, Lawrence, v. 42, n. 2, p. 172-179, 1994.

TRANEL, P. J.; WRIGHT, T. R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? **Weed Science**, Lawrence, v. 50, n. 6, p. 700-712, 2002.

TREZZI, M. M. **Avaliação do potencial alelopático de genótipos de sorgo**. Porto Alegre: UFRGS, 2002. 126 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

TREZZI, M. M.; FELIPPI, C. L.; MATTEI, D.; SILVA, H. L.; NUNES, A. L.; DEBASTIANI, C.; VIDAL, R. A.; MARQUES, A. Multiple resistance of acetolactate synthase and protoporphyrinogen oxidase inhibitors in *Euphorbia heterophylla* biotypes. **Journal of Environmental Science and Health. Part B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, New York, v. 40, n. 1, p. 101-109, 2005.

UCHINO, A.; OGATA, S.; KOHARA, H.; YOSHIDA, S.; YOSHIOKA, T.; WATANABE, H. Molecular basis of diverse responses to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in sulfonylurea – resistant biotypes of *Schoenoplectus juncooides*. **Weed Biology and Management**, Oxon, v. 7, n. 2, p. 89-96, 2007.

UMBARGER, H.E. Amino acid biosynthesis and its regulation. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 47, p. 533-606, 1978.

VARGAS, L.; BORÉM, A.; SILVA, A. A. Herança da resistência aos herbicidas inibidores da ALS em biótipos da planta daninha *Euphorbia heterophylla*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 19, n.3, p.331-336, 2001.

VARGAS, L.; SILVA, A. A.; BORÉM, A.; FERREIRA, F. A.; TAVARES, S.; SEDIYAMA, T. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 1. ed. Viçosa: JARD Prod. Gráficas Ltda, 1999. 131p.

VIDAL, R. A.; FLECK, N.G. Análise do risco da ocorrência de plantas daninhas resistentes aos herbicidas no Brasil. **Planta Daninha**, Botucatu, v. 15, n. 2, p. 152-161, 1997.

VIDAL, R. A.; LAMEGO, F. P.; TREZZI, M. M. Diagnóstico da resistência aos herbicidas em plantas daninhas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 24, n. 3, p. 597-604, 2006.

VIDAL, R. A.; LAMEGO, F. P.; TREZZI, M. M. An innovative strategy for early detection of herbicide resistant weeds in the farm helps to quarantine and to contain the problem. In: ANNUAL MEETING OF THE WEED SCIENCE

SOCIETY OF AMERICA, 46., 2006, New York. **Abstracts...**New York: WSSA, 2006b. p. 92-93.

VIDAL, R. A.; MEROTTO Jr., A. **Herbicidologia**. Porto Alegre: Vidal, R. A. & MEROTTO Jr., A. 152p. 2001.

VIDAL, R. A.; TREZZI, M. M. Desenvolvimento comparativo entre biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 5, n. 1, p. 122-126, 1999.

VIDAL, R. A.; TREZZI, M. M.; DE PRADO, R.; RUIZ-SANTAELLA, J. P.; VILA-AIUB, M. M. Glyphosate resistant biotypes of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* (L.)) and its risk analysis on glyphosate-tolerant soybeans. **Journal of Food Agriculture & Environment**, Helsinki, v. 5, n. 2, p. 265-269, 2007.

VOLENBERG, D. S.; STOLTENBERG, D. E. Inheritance of resistance in eastern black nightshade (*Solanum nigrum*) to acetolactate synthase inhibitors. **Weed Science**, Lawrence, v. 50, n. 6, p. 731-736, 2002.

ZHENG, D.; PATZOLDT, W. L.; TRANEL, P. J. Association of the W574L ALS substitution with resistance to cloransulam and imazamox in common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*). **Weed Science**, Lawrence, v. 53, n. 4, p. 424-430, 2005.

WAGNER, J.; HASS, H. U.; HURLE, K. Identification of ALS inhibitor-resistant *Amaranthus* biotypes using polymerase chain reaction amplification of specific alleles. **Weed Research**, Oxford, v. 42, n. 4, p. 280-286, 2002.

WANG, G.; WATANABE, W.; UCHINO, A.; ZHOU, J.; ITOH, K. Inheritance of sulfonylurea resistance in a paddy weed, *Monochoria korsakowii*. **Journal of Pesticides and Science**, Tokyo, v. 28, n. 2, p. 212-214, 2003.

WARWICK, S.I.; BLACK, L.D. Relative fitness of herbicide-resistant and susceptible biotypes of weeds. **Phytoprotection**, Quebec, v.75, n.1, p.37-49, 1994.

WHALEY, C. M.; WILSON, H. P.; WESTWOOD, J. H. A new mutation in plant ALS confers resistance to five classes of ALS-inhibiting herbicides. **Weed Science**, Lawrence, v. 55, n. 2, p. 83-90, 2007.

WOODWORTH, A. R.; ROSEN, B. A.; BERNASCONI, P. Broad range resistance to herbicides targeting acetolactate synthase (ALS) in a field isolate of *Amaranthus* sp. is conferred by a Trp to Leu mutation in ALS gene. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, n. 4, p. 1353, 1996.

8 APÊNDICES

APÊNDICE 1. Análise de aminoácidos totais de sementes dos biótipos de *Bidens subalternans* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da enzima ALS, pelo método de cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Aminoácido	Suscetível (%) ¹	Resistente (%)	% do R em relação ao S
Alanina	10,7	10,4	-3
Arginina	6,3	6,4	1
Asparagina	12,2	13,2	8
Cisteína	1,1	0,9	-18
Fenilalanina	6,5	6,7	3
Glicina	11,5	10,8	-6
Glutamina	10,5	10,1	-4
Histidina	1,8	2,2	22
Isoleucina	4,9	5,4	10
Leucina	4,1	4,1	---
Lisina	2,5	2,3	-8
Metionina	1,0	0,8	-20
Prolina	5,8	5,7	-2
Serina	7,0	6,6	-6
Tirosina	4,2	4,6	9,5
Treonina	4,5	4,2	-7
Valina	4,9	5,4	10
Total ²	100	100	4,2

¹ Percentagem em relação à quantidade de aminoácidos totais para cada biótipo.

² Total de aminoácidos (g 100 g⁻¹) para o biótipo S e R, equivalentes a 11,51 e 11,99, respectivamente.

APÊNDICE 2. Glossário de nomes químicos.

acifluorfen: 5-[2-cloro-4-(trifluorometil)fenoxi]-2-ácido nitrobenzóico

bentazon: 3-isopropil-1H-2,1,3-benzothiadiazin-4(3H)-one-2,2-dioxide

byspiribac-sodium: sodium 2,6-bis (4,6-dimethoxipirimidin-2-yloxy) bezoato

clomazone: (2-[(2-clorofenil) metil]-4,4-dimetil-3-isoxazolidinona)

chlorimuron-ethyl: 2-[[[(4-cloro-6-methoxi-2-pirimidinil) amino] carbonil] amino] sulfonil] ácido benzóico

CPCA: ácido ciclopropanodicarboxílico

CTAB: brometo de cetiltrimetilamônio

Cloransulam-methyl: 3-chloro-2-[[[(5-ethoxi-7-fluoro[1,2,4] triazolo [1,2-c]pirimidin-2yl) sulfonil] amino] ácido benzóico

EDTA : ácido etilenodiaminotetraacético

fomesafen: 5-[2-cloro-4-(trifluorometil)fenoxi]-*N*-metilsulfonil-2-nitrobenzamido

glyphosate: (*N*-(fosfonometil) glicina)

glufosinato de amônia: 4-hidroxi (metil) fosfinol-DL-homoalanina sal de amônio

imazethapyr: 2-[4,5-dihidro-4-metil-4-(1-metiletil)-5-oxo-1 *H*-imidazol-2-yl]5-etil-3-ácido piridinecarboxílico

lactofen: ±)-2etoxi-1-metil-2-oxoetil-5-[2-cloro-4-(trifluorometil)fenoxil]-2-nitrobenzoato

metribuzin: (4-amino-6(1,1-dimetiletil)-3-metiltio-1,2,4-triazin-5(4H)-ona)

pyrithiobac-sodium: sodium 2-chloro-6-(4,6-dimethoxipirimidin-2-ylthio)-benzoato

SDS: lauril sulfato de sódio

SSC: solução contendo cloreto de sódio e citrato de sódio

APÊNDICE 3. Resumo da análise de variância para efeitos de biótipos de *B. subalternans* suscetível e resistente, herbicidas e doses - Ensaio 1. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2006.

Causas da variação	Graus de liberdade	Quadrados médios	
		Controle	21 DAT ^a
Biótipo	1	234952,0	*** ^b
Herbicida	3	2,8	ns
Dose (Biótipo)	39	3218,3	***
Biótipo x Herbicida	3	2,0	ns
Herbicida x Dose (Biótipo)	1	18,1	*
CV (%) ^c		5,03	

^a Dias após a aplicação dos tratamentos.

^b ***, ** ou * Valores significativos aos níveis de 0,1%, 1% ou 5% de probabilidade do erro experimental, respectivamente; ns = ausência de significância.

^c Coeficiente de variação.

APÊNDICE 4. Resumo da análise de variância para efeitos de biótipos de *B. subalternans* suscetível e resistente, herbicidas e doses - Ensaio 2. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008.

Causas da variação	Graus de liberdade	Quadrados médios	
		Controle 28 DAT ^a	MSPA ^d
Biótipo	1	203470,5 *** ^b	5126,7 *** ^b
Herbicida	3	3,4 ns	3,5 ns
Dose (Biótipo)	47	4573,5 ***	176,6 ***
Biótipo x Herbicida	3	2,4 ns	2,4 ns
Herbicida x Dose (Biótipo)	1	20,8 *	20,9 *
CV (%) ^c		4,68	13,63

^a Dias após a aplicação dos tratamentos.

^b ***, ** ou * Valores significativos aos níveis de 0,1%, 1% ou 5% de probabilidade do erro experimental, respectivamente; ns = ausência de significância.

^c Coeficiente de variação.

^d Massa seca da parte aérea.

APÊNDICE 5. Resumo da análise de variância para efeitos de biótipos de *B. subalternans* suscetível e resistente, herbicidas e doses. University of Arkansas, Fayetteville – AR, 2007.

Causas da variação	Graus de liberdade	Quadrados médios	Controle 21 DAT^a
Biótipo	1	10879,6	*** ^b
Herbicida	3	1559,5	***
Dose (Biótipo)	45	2865,3	***
Biótipo x Herbicida	3	551,5	***
Herbicida x Dose (Biótipo)	3	1422,2	***
CV (%) ^c		8,30	

^a Dias após a aplicação dos tratamentos.

^b ***, ** ou * Valores significativos aos níveis de 0,1%, 1% ou 5% de probabilidade do erro experimental, respectivamente; ns = ausência de significância.

^c Coeficiente de variação.

APÊNDICE 6. Resumo da análise de variância para efeitos de biótipos de *B. subalternans* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS e época de avaliação (dias). University of Arkansas, EUA, 2007.

Causas da variação	Graus de liberdade	Quadrados médios							
		Estatura de planta	MSPA ^a		MSR ^b		MST ^c		MSPA/MSR
Biótipo	1	204,7 **	0,08	ns	0,19	ns	0,02	ns	0,55 **
Época	4	4360,0 ***	28,4 ***		40,7 ***		30,4 ***		1,26 ***
Biótipo x Época	4	84,8 **	0,07	ns	0,06	ns	0,08	ns	0,02 ns
CV (%) ^d		14,89	8,13		12,38		7,92		11,85

^a MSPA= matéria seca da parte aérea.

^b MSR = matéria seca de raízes.

^c MST = matéria seca total.

^d Coeficiente de variação.

*** e ** Valores significativos aos níveis de 0,1% e 1 de probabilidade do erro, respectivamente; ns = não significativo. = não significativo. Coeficiente de variação = 14,89%.

APÊNDICE 7. Resumo da análise de variância para efeitos de biótipos de *B. subalternans* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS e época de avaliação (dia). UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008.

Causas da variação	Graus de liberdade	Quadrados médios									
		Estatura de planta		MSPA ^a		MSR ^b		MST ^c		MSPA/MSR	
Biótipo	1	0,11	ns	0,05	ns	0,44	ns	0,07	ns	0,20	ns
Época	4	3,38	***	16,05	***	8,02	***	14,0	***	2,14	***
Biótipo x Época	4	0,44	**	0,09	ns	0,20	ns	0,08	ns	0,19	*
CV (%) ^d		13,91		10,66		18,47		10,22		15,06	

^a MSPA= matéria seca da parte aérea.

^b MSR = matéria seca de raízes.

^c MST = matéria seca total.

^d Coeficiente de variação.

***, ** e * Valores significativos aos níveis de 0,1% , 1 e 5% de probabilidade do erro, respectivamente; ns = não significativo.

APÊNDICE 8. Resumo da análise de variância para efeitos de biótipos de *B. subalternans* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS e época de avaliação (dias). University of Arkansas, 2007.

Causas da variação	Graus de liberdade	Quadrados médios	
		Germinação acumulada	
Biótipo	1	20196,57	*** ^a
Época	6	20097,14	***
Biótipo x Época	6	1638,57	**
CV (%) ^b		34,7	

^a*** e ** Valores significativos aos níveis de 0,1% e 1% de probabilidade do erro, respectivamente.

^b Coeficiente de variação.

APÊNDICE 9. Resumo da análise de variância para efeitos de biótipos de *B. subalternans* suscetível e resistente aos herbicidas inibidores da ALS, época de avaliação (dias) e temperatura. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008.

Causas da variação	Graus de liberdade	Quadrados médios	
		Germinação Acumulada (%)	
Biótipo	1	1288,1	*
Época de avaliação	5	28348,7	***
Temperatura	4	13431,2	***
Biótipo x Época	5	115,4	ns
Biótipo x Temperatura	4	3213,9	***
Época x Temperatura	20	2055,6	***
Biótipo x Época x Temperatura	20	471,1	*
CV (%) ^a		31,03	

^a Coeficiente de variação.

***, ** e * Valores significativos aos níveis de 0,1%, 1 e 5% de probabilidade do erro, respectivamente; ns = não significativo.

9 VITA

Fabiane Pinto Lamego é filha de Paulo Roberto dos Anjos Lamego e Maria de Jesus Pinto Lamego. Nasceu em Rio Grande – RS, em 02 de maio de 1978. cursou o primeiro grau no Instituto Cristo Rei e no Instituto de Educação Juvenal Miller, em Rio Grande – RS. Completou o segundo grau no Colégio Técnico Industrial (CTI), formando-se Técnica em Processamento de Dados em 1996. Em 1997 ingressou no Curso de Agronomia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas – RS, onde graduou-se Engenheira Agrônoma em 2002. No mesmo ano, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre – RS. Obteve o grau de Mestre em Fitotecnia em julho de 2004. Em março de 2005, ingressou no curso de Doutorado em Fitotecnia da UFRGS. No período de março de 2007 a fevereiro de 2008 realizou doutorado sanduíche na University of Arkansas, em Fayetteville – AR, EUA, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).